



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Medicina**

# **Importancia Pronóstica y Predictiva del estudio del oncogén *HER2* en Adenocarcinomas Gástricos**

**TESIS DOCTORAL**

**Carlos Gómez Martín**

**Madrid, 2010**

## INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

D. Fernando López-Ríos Moreno, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad Complutense de Madrid, Profesor Adjunto de la Facultad de Medicina la Universidad San Pablo-C.E.U., y


Dña. Elena Garcia Garcia, Doctora por la Universidad Complutense de Madrid y Profesora Colaborador Doctor de la Facultad de Medicina de la Universidad San Pablo-C.E.U.,

### CERTIFICAN

Que D. Carlos Gómez Martín, Licenciado en Medicina y Cirugía por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado **“Importancia Pronóstica y Predictiva del estudio del oncogén HER2 en Adenocarcinomas Gástricos”**. Consideramos que dicho trabajo recoge la investigación original realizada por el interesado, quien ha demostrado notable capacidad de trabajo y seriedad científica en su elaboración. El trabajo elaborado reúne todos los requisitos necesarios para su presentación como Tesis Doctoral, al objeto de optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.


Y para que así conste, a los efectos oportunos, firmamos la presente

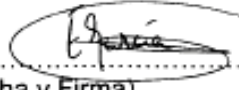
VºBº  
EL TUTOR

  
Fdo: J. Felin  
(Fecha y Firma) 28-5-2010  
DNI N°:

5365384J

Los Directores de la Tesis

  
Fdo: 28/5/10  
(Fecha y Firma)  
DNI N°: 07230937J

  
Fdo: 28 de Mayo de 2010  
(Fecha y Firma)  
DNI: 08033147Y

**A Alba**

# AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Fernando Lopez-Rios**, Director de esta tesis, por abrirme las puertas de su Laboratorio de Dianas Terapéuticas y de la investigación traslacional en Oncología. Me es imposible expresar mi gratitud por su entusiasmo, profesionalidad y dedicación durante la elaboración de esta tesis. Gracias por todo ello y, por encima de todo, gracias por tu amistad sincera durante más de 20 años.

A la **Dra Elena Garcia**, Co-Directora de esta tesis. Gracias por su ayuda, consejos y paciencia infinita durante todo el tiempo que ha durado este trabajo. Gracias por ayudarme a descubrir el mundo de la patología molecular y su necesaria aplicación en la Oncología clínica.

A las **Dras Esther Conde y Ana Suarez** por su ayuda desinteresada y fundamental a la hora de elaborar esta tesis. Gracias por vuestra disponibilidad en medio de tantos proyectos y trabajos.

A **Pilar Redondo, Barbara Angulo y Rebeca Martinez**, del Laboratorio de Dianas Terapéuticas del Hosp Universitario Madrid-Norte, por su labor y conocimientos técnicos que han sido imprescindibles en el desarrollo del trabajo experimental de esta tesis

A los **Drs. Alberto Arcediano, Anabel Ballesteros y Maria Jose Echarri**, por su ayuda en la obtención de parte de las muestras histopatológicas de este trabajo.

A la **Dra. Dolores Ferrandez**, sin cuya inestimable ayuda esta tesis no hubiera podido llevarse a a cabo. Gracias por tu confianza en este proyecto que espero sea el primero de muchos otros.

A **Candela y Alonso**, por tantas noches de trabajo compartidas.

A **mis padres, Carlos y Sagrario**, por habeme dado la oportunidad de formarme como médico. Sin esa piedra inicial esta tesis nunca se hubiera construido.

A **los pacientes**, protagonistas últimos e inconscientes de este trabajo.

# INDICE

<b>INDICE</b>	<b>7</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>15</b>
<b>EPIDEMIOLOGÍA</b>	<b>16</b>
<b>ETIOLOGÍA</b>	<b>18</b>
Susceptibilidad genética hereditaria	18
Cáncer gástrico esporádico	19
<b>HISTOLOGÍA</b>	<b>26</b>
Clasificaciones macroscópicas	26
Clasificaciones microscópicas	29
<b>ESTADIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN.</b>	<b>35</b>
Estadificación o clasificación histológica	35
Estadificación topográfica	35
Estadificación TNM.	36
Clasificación japonesa.	37
<b>FACTORES PRONÓSTICOS EN CÁNCER GÁSTRICO</b>	<b>40</b>
Factores clinico-patológicos	40
Factores pronósticos moleculares.	45
<b>FACTORES PREDICTIVOS EN CÁNCER GÁSTRICO</b>	<b>50</b>

**TRATAMIENTO DEL CÁNCER GÁSTRICO ----- 53**

Tratamiento quirúrgico del cáncer gástrico ----- 53

Tratamiento sistémico del cáncer gástrico ----- 61

Moléculas nuevas en el tratamiento del cáncer gástrico ----- 76

**EL ONCOGÉN *HER 2/NEU* ----- 84**

Mecanismos de activación ----- 86

Terapias dirigidas frente a *her2* ----- 89

HER 2 y neoplasia de mama ----- 92

HER 2 y otros tumores sólidos no gástricos ----- 95

**HER2 Y CÁNCER GÁSTRICO ----- 98**

Estudios de la sobreexpresión de HER 2 en cáncer gástrico ----- 98

Estudios de la amplificación de *HER 2* en cáncer gástrico ----- 100Correlación del estado de *HER 2* en cáncer gástrico con otras variables  
patológicas. ----- 101Concordancia entre la sobreexpresión de HER 2 y la amplificación del gen  
*HER 2* en cáncer gástrico ----- 104Sobreexpresión y amplificación de *hHER 2* como factor pronóstico y  
predictivo en cáncer gástrico ----- 107

Estudios preclínicos con fármacos dirigidos contra HER 2 ----- 110

Estudios clínicos con fármacos dirigidos contra HER 2 ----- 113

**MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DEL ESTADO DEL ONCOGÉN  
*HER2* ----- 120**

Inmunohistoquímica ----- 122

FISH (hibridación *in situ* fluorescente) ----- 125CISH (hibridación *in situ* cromogénica) ----- 127SISH (hibridación *in situ* argéntica) ----- 131**OBJETIVOS ----- 137**



## **MATERIAL Y MÉTODOS -----140**

Selección de casos -----	141
Recogida de datos clinicos -----	141
Estudio histológico -----	142
Estudio de Inmunohistoquímica para la determinación de HER 2. -----	144
Estudio de FISH para la determinación de <i>HER 2</i> -----	144
Estudio de CISH dual para la determinación de <i>HER 2</i> -----	145
Estudio de SISH para la determinación de <i>HER 2</i> .-----	146
Fase postanalítica (interpretación) -----	148
Almacenamiento de los datos y estudio estadístico-----	149

## **RESULTADOS -----152**

Resultados de la determinación del estado HER 2 por inmunohistoquímica (IHQ) -----	153
Resultados de la determinación del estado <i>HER 2</i> por FISH -----	156
Resultados de la determinación del estado <i>HER 2</i> por SISH -----	159
Resultados de la determinación del estado de <i>HER 2</i> por dc-CISH -----	164
Resultados del estudio clínico – patológico -----	170
Análisis de la supervivencia global en el grupo de pacientes metastásicos. -----	182
Resultados del estudio de inmunohistoquímica para la determinación de HER 2 -----	188
Resultados del estudio de FISH para la determinación de <i>HER 2</i> -----	201
Resultados del estudio SISH para la determinación de <i>HER 2</i> -----	213
Análisis de correlación y consistencia de resultados entre los distintos métodos de determinación de la amplificación de <i>HER 2</i> -----	248

## **DISCUSIÓN-----252**

Resultados clínico-patológicos -----	254
--------------------------------------	-----

Relación entre el oncogén <i>HER2</i> y otros rasgos clínico-patológicos en el adenocarcinoma gástrico. ....	257
Correlación entre los resultados del análisis inmunohistoquímico de <i>HER2</i> y las técnicas de hibridación <i>in situ</i> FISH y SISH dual en adenocarcinoma gástrico. ....	259
Concordancia entre las técnicas de hibridación <i>in situ</i> FISH y SISH dual en adenocarcinoma gástrico. ....	265
Sobreexpresión y amplificación de <i>HER2</i> como factor pronóstico en Adenocarcinoma Gástrico. ....	270
Sobreexpresión y amplificación de <i>HER2</i> como factor predictivo de respuesta al tratamiento con Trastuzumab en Adenocarcinoma Gástrico. ....	273
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>276</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>279</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>324</b>

# JUSTIFICACIÓN

El adenocarcinoma gástrico es, en el momento actual, el 4º tipo de neoplasia maligna más frecuente y la 2ª causa de muerte por cáncer en el mundo. A nivel mundial la incidencia supera el millón de casos anuales y la supervivencia global es inferior al 30% pasados 5 años desde el momento del diagnóstico inicial de los pacientes.

Esta situación no se ha modificado a pesar de constatar un descenso mantenido en la incidencia de cáncer gástrico desde la década de 1940. Este pronóstico infausto está determinado por el elevado porcentaje de pacientes que se diagnostican en estadios avanzados de la enfermedad (más del 70% en los países occidentales), y por el aumento relativo de los adenocarcinomas gástricos localizados en la unión gastroesofágica, de difícil tratamiento quirúrgico con intención curativa. Incluso con el empleo de quimioterapia o quimio y radioterapia complementaria a la cirugía, el pronóstico de estos pacientes sigue siendo ominoso a largo plazo.

A pesar de las mejoras introducidas en el tratamiento con el desarrollo de nuevos citostáticos y esquemas de poliquimioterapia de combinación de los mismos, la supervivencia de los pacientes diagnosticados en fase metastásica es inferior al año.

El estudio de las alteraciones moleculares presentes en el adenocarcinoma gástrico y relevantes en su etiopatogenia, puede llevar a una mejora sustancial en los resultados de los tratamientos oncológicos y a una reducción necesaria de la toxicidad de los mismos.

Para desarrollar tratamientos dirigidos específicamente frente a estas alteraciones moleculares, se hace imprescindible establecer la frecuencia con

la que las mismas se expresan en el tumor e investigar cuál o cuáles son los mejores métodos para su evaluación como factores predictivos de respuesta al tratamiento.

En la presente tesis se analiza la incidencia de una alteración molecular concreta detectada en los adenocarcinomas gástricos, la sobreexpresión proteica y amplificación del oncogén *HER2*, estudiándose además su posible carácter pronóstico y su potencial empleo como factor predictivo de respuesta al tratamiento con fármacos dirigidos frente al receptor HER2. Además se analiza la correlación entre las distintas técnicas de diagnóstico molecular disponibles y se valida una de ellas como posible nuevo método diagnóstico de referencia.

# INTRODUCCIÓN

## EPIDEMIOLOGIA

A pesar de un descenso sostenido en la incidencia de Cáncer Gástrico (CG) en los Estados Unidos de América y en la mayoría de los países desde la década de 1950, en el año 2000 el CG supuso el 4º tipo de cáncer más frecuente y la 2ª causa de muerte por cáncer a nivel mundial (Brown LM 2002). Se estiman en unos 876.000 los casos nuevos cada año y aproximadamente en 647.000 las muertes anuales por esta causa, de las cuales un 60 % ocurren en países en vías de desarrollo. Las mayores tasas de incidencia se observan en Japón, Asia Oriental, regiones andinas de Sudamérica y Europa del Este. Por el contrario las tasas más bajas se documentan en el norte y Este de África, Europa del Norte y América del Norte (Parkin DM 2004).

En Europa se diagnosticaron 96.000 nuevos casos en el año 2006, falleciendo por este cáncer un total de 71.000 personas (Ferlay J 2007). En España la incidencia estimada para el año 2015 utilizando el programa Globocan será de 11238 casos nuevos (Globocan 2002), discretamente superior a la media europea. Según los datos publicados por el Instituto de salud Carlos III en el año 2007 murieron por cáncer gástrico 3507 hombres y 2230 mujeres (Centro Nacional de Epidemiología 2009). En nuestro país el CG supone la 4ª causa de muerte por cáncer en varones (detrás del cáncer de pulmón, próstata y colon) y la 3ª en mujeres (tras el cáncer de mama y colon), siendo la supervivencia global de la enfermedad inferior al 30% a los 5 años del diagnóstico (Instituto de Salud Carlos III 2005).

Del total de los CG diagnosticados el 90% corresponden a adenocarcinomas (ACG), siendo el tipo intestinal el más frecuente en las áreas de mayor incidencia y el difuso en la de menor (Muñoz M 1988).

De manera reciente se ha reconocido que los factores de riesgo, la distribución geográfica y la edad de aparición del ACG difieren según la localización anatómica del tumor (unión gastroesofágica UGE, estómago proximal o cardias frente a estómago distal) y el principal tipo histológico de acuerdo con la clasificación de Lauren (intestinal *versus* difuso). Aunque la incidencia de ACG no localizado en el cardias ha descendido de manera global en el mundo en las últimas décadas, la incidencia de los tumores de cardias se ha mantenido estable e incluso a aumentado ligeramente en algunos países europeos, Japón y EEUU (Hansen S 1997, Botterweck AA 2000, Liu Y 2004).

El Adenocarcinoma de tipo intestinal es el tipo histológico más frecuente en las áreas de mayor incidencia y parece ser el responsable de la variación a nivel internacional de la cifras de CG (Henson DE 2004). Desde la década de 1950 el descenso en la incidencia de ACG ha sido preferentemente de casos del tipo intestinal, haciendo que el tipo difuso sea relativamente más frecuente que con anterioridad. El descenso en los casos del tipo intestinal se ha documentado en EEUU y Japón mientras los casos de tipo difuso han aumentado en EEUU o se han mantenido estables (Japón) (Kaneko S 2001). En otros países como Finlandia el cambio en la incidencia de los diferentes tipos ha hecho que el tipo difuso sea el cáncer gástrico más habitualmente diagnosticado en pacientes menores de 60 años (Lauren PA 1993).



## ETIOLOGIA

### SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA HEREDITARIA

Aunque la mayoría de los ACG aparecen de manera esporádica y sin un componente hereditario obvio, se estima que en un 8%-10% de los casos poseen cierto componente hereditario o familiar (La Vecchia C 1992) y hasta en un 12%-25% son debidos a una predisposición genética que se caracteriza por la agrupación familiar y un patrón de herencia dominante (Goldgar DE 1994).

Aproximadamente un 30% de estos casos hereditarios corresponden a los denominados cáncer gástrico difuso hereditario. En estos pacientes se ha identificado una mutación en la línea germinal de uno de los alelos del gen que codifica la proteína de adhesión celular E-cadherina (CDH1) en su locus 16q (Guilford PJ 1999). Se han descrito más de 14 mutaciones de este gen que afectan a 8 de sus 16 exones (Shinmura K 1999). La inactivación del 2º alelo puede ocurrir entonces por mutación o hipermetilación (Barber M 2008). El riesgo de desarrollar un CG a lo largo de su vida en las personas portadoras de una mutación en el gen CDH1 es del 67% en hombres y del 83% en mujeres. Dado este riesgo elevado, ante la existencia de 2 ó más casos de cáncer gástrico difuso en una familia con uno de ellos diagnosticado antes de los 50 años, se aconseja el estudio genético de los familiares y la valoración de una posible gastrectomía profiláctica (Brooks-Wilson AR 2004).

Asimismo se han caracterizado cuadros de ACG hereditario de tipo intestinal. El mejor conocido es el síndrome de predisposición genética que aparece en los pacientes con Cáncer de Colon Hereditario No polipósico (Síndrome de

Lynch o HNPCC) (Gyling A 2007). En estos casos la alteración genética se ha identificado en forma de mutaciones en los denominados genes de reparación de errores del ADN ("Mismatch Repair Genes") (Kinzler KW 1996), provocando el desarrollo de adenocarcinomas de tipo intestinal, sin evidencia de infección por *Helicobacter pylori* y evidenciándose frecuentemente inestabilidad de microsatélites en la pieza tumoral (MLH1 y MSH2) (Aarnio M 1997). La incidencia de ACG asociado a HNPCC ha disminuido de manera similar a lo ocurrido en las últimas décadas con el ACG en los países desarrollados (Renkonen-Sinisalo L 2002).

Otros Síndromes de CG hereditario de tipo intestinal incluyen los descritos en portadores de mutaciones del gen *APC* en casos de Poliposis Adenomatosa Familiar o del gen *LKB1/STK11* en el Síndrome de Peutz-Jeghers (Hofgärtner WT 1999, Shinmura K 2005).

## CÁNCER GÁSTRICO ESPORÁDICO

La mayoría de los cánceres gástricos ocurren de manera esporádica y están en relación con factores ambientales como la dieta o la alimentación. La importancia del estilo de vida queda reflejada en estudios como el publicado en 2006 sobre la diferente incidencia del ACG en el medio rural y urbano en China (Yang L 2006). En este estudio se comparó la tasa de mortalidad por ACG en 2 periodos distintos (1973-1975 y 1990-1992) en poblaciones urbanas y rurales. Mientras que en el medio rural la mortalidad aumentó un 25.8%, en el medio urbano disminuyó un 23.8%.

Entre los factores etiológicos que se han relacionado con la aparición y el desarrollo del ACG se encuentran fundamentalmente los ambientales, el consumo de tabaco y la infección por *H. pylori*.

---

## PAPEL DE LA DIETA

El consumo elevado y mantenido de irritantes de la mucosa gástrica como la sal y los nitratos provoca inflamación crónica de la misma y gastritis superficial, pudiendo conllevar al desarrollo de una gastritis atrófica (Hill Mj 1995, Hirohata T 1997). En ésta situación de atrofia se produce un incremento en el pH gástrico, lo cual favorece el crecimiento de bacterias anaerobias que reducen los nitratos a nitritos y, ocasionalmente, pueden formar derivados N-Nitroso mutagénicos. La influencia del consumo de sal en la aparición y desarrollo posterior de alteraciones patológicas de la mucosa gástrica fue demostrada en un estudio japonés publicado en 1996 (Inoue M 1996). En dicho estudio una cohorte de 5737 personas fue seguida durante un periodo de 6 años, diagnosticándose en ese periodo 69 casos de ACG entre los integrantes de la cohorte. El riesgo de desarrollar un ACG fue 2.2 veces más alto entre aquellos que presentaban gastritis atrófica en el momento de su inclusión en el estudio. Entre aquellos con gastritis atrófica el riesgo se elevaba 1.8 veces si se mantenía un consumo elevado de comidas picantes mientras que disminuía 0.6 veces si se reducía la ingesta de alimentos salados.

Por el contrario una ingesta elevada de frutas y vegetales en la dieta diaria se ha asociado con una reducción en el riesgo de desarrollar ACG. Los antioxidantes como los Beta carotenos, Alfa-Tocoferol (vitamina E) y Acido Ascórbico (Vitamina C) podrían actuar evitando la formación de mutágenos y

carcinógenos en el estómago (Vainio H 2003), aunque no se conoce con exactitud su papel exacto en la etiología del CG.

---

## CONSUMO DE TABACO Y ALCOHOL.

El consumo de cigarrillos está considerado un agente causal de ACG tanto en hombres como en mujeres (IARC 2004). El riesgo aumenta proporcionalmente con el número de cigarrillos fumados y con la duración del consumo, reduciéndose de manera progresiva tras el abandono del mismo. La interferencia en este caso de otros factores como el consumo de alcohol, la dieta o la infección por *H. pylori*, puede ser excluida según los datos de la International Agency for Research on Cancer (IARC). Aproximadamente un 18% de los casos de ACG pueden ser atribuidos al consumo de tabaco (Sjödahl K 2007).

La misma IARC descartaba en 1988 el consumo de alcohol como un factor etiológico definitivo para el desarrollo de ACG. Los múltiples estudios llevados a cabo en los últimos 20 años no han aportado nuevas evidencias sobre el tema por lo cual el consumo de bebidas alcohólicas no se considera un factor de riesgo probado para el desarrollo de ACG (IARC 1988, Terry MB 2002).

---

## INFECCIÓN POR HELICOBACTER PYLORI.

*H Pylori* fue aislado en 1982 y reconocido por la IARC como un carcinógeno en humanos en 1994 (IARC 1994), reconociéndose la infección por el mismo como un factor necesario pero no suficiente por si solo para el desarrollo del ACG.

El ACG esporádico de tipo intestinal se desarrolla a través de una secuencia conocida de lesiones precursoras que son inducidas por la infección por *H Pylori*. Esta infección provoca la aparición de gastritis atrófica y posteriormente metaplasia intestinal, lo que conlleva un aumento en el riesgo relativo de desarrollar ACG que es 1.7 veces mayor en los casos de atrofia moderada, 4.9 veces superior en los de atrofia severa y 6.4 veces en los de metaplasia intestinal; siempre referidos a la población no infectada (Uemura N 2001).

Los estudios iniciales sobre la relación entre *H Pylori* y CG estaban limitados por su carácter retrospectivo y por haber sido efectuados sobre pacientes previamente diagnosticados de CG. Esto unido a que la infección por *H Pylori* tiende a desaparecer conforme se establece el cuadro de metaplasia intestinal y gastritis atrófica que preceden al desarrollo del ACG de tipo intestinal reducía de manera notable la consistencia de los datos aportados.

Diversos estudios prospectivos se han publicado en los últimos años así como varios meta análisis de los mismos (Huang JQ 1998, Eslick GD 1999, Danesh J 1999). El meta análisis presentado por el Helicobacter and Cancer Collaborative Group incluía 12 de estos estudios que sumaban 1228 cánceres y 3406 controles (Helicobacter and Gut Collaborative Group 2001). De manera global la infección por *H Pylori* aumenta el riesgo de ACG 2.36 veces (95%CI 1.98 – 2.81), aunque en el análisis por localización tumoral sólo aumentaba el riesgo de aparición de tumores no cardiales (Cardias Odds Ratio 0.99; No cardiac Odds Ratio 2.97). Asimismo el riesgo de desarrollar ACG aumenta conforme mayor es el tiempo de infección, de esta manera el riesgo fue 5.9 veces mayor en los casos en los cuales la infección fue documentada más de 10 años antes del diagnóstico de ACG.

Epidemiológicamente los países con mayor incidencia de CG son también los de mayor incidencia de infección por *H Pylori*, habiéndose documentado como en los países desarrollados el descenso en la incidencia de infección por *H Pylori* va seguido por una caída en la incidencia de CG (Parsonnet J 1995, Howson CP 1986). En humanos la infección por *H Pylori* puede ser detectada, entre otros medios, por la presencia de anticuerpos anti *H Pylori* en sangre. Es una infección común que afecta al 74% de los individuos de edad media en los países desarrollados y al 58% en los países en vías de desarrollo. La prevalencia de infección aumenta con la edad y se ha demostrado en adultos sanos que siguen programas de salud que incluyen controles periódicos que la tasa de seroconversión y seroreversión de la infección medidas durante un periodo de 9 años son prácticamente idénticas (6.3% y 7.1% respectivamente) (Kikuchi S 2004).

Recientemente se ha secuenciado el genoma completo del *H Pylori*, demostrándose la existencia de secuencias específicas comunes a distintas cepas del germen, aunque no todas las cepas tienen el mismo potencial carcinogénico. Por ejemplo; en humanos la infección por cepas cag-A (+) está relacionada con una mayor prevalencia de gastritis atrófica y unos mayores niveles de Inmunoglobulina (Ig) G anti *Pylori* que la infección por cepas cag-A (-) (Kuipers EJ 1995, Blaser MJ 1995). Asimismo el *H Pylori* produce una citotoxina vacuolizante denominada vac-A (Franco AT 2008). En algunos países se ha comprobado que las áreas con mayor riesgo de ACG son también las de mayor frecuencia de genotipos cag-A (+) y vac-1s1 y m1 en las cepas de *H Pylori* aisladas (Bravo LE 2002).

El papel etiológico del *H Pylori* en la carcinogénesis del ACG se ha demostrado experimentalmente mediante la inoculación de cepas de *H Pylori* cag-A (+) y vac-A(+), centrándose en el momento actual las investigaciones en la búsqueda de genes cepa-específicos que pudieran estar implicados en la carcinogénesis gástrica (Watanabe T 1998, Kato S 1997). El efecto carcinogénico viene determinado por el stress oxidativo que provoca la infección por *H Pylori* en la mucosa gástrica y, dado que este microorganismo se localiza en el moco que recubre el epitelio gástrico normal y no en el de las zonas con metaplasia intestinal donde se origina habitualmente la neoplasia, es necesaria asimismo la presencia de carcinógenos solubles en la luz gástrica para el desarrollo de la neoplasia. En las células inflamatorias y de la lamina propia en los casos de gastritis es posible detectar la Sintetasa de Oxido Nitrico inducible (iNOS). El óxido nítrico es necesario para la renovación de las células más profundas del epitelio foveolar y de los folículos linfoides. En la mucosa precancerosa iNOS migra hacia zonas más superficiales del epitelio foveolar donde se puede producir daño en el ADNA celular. El aumento del pH intragástrico en los casos de gastritis atrófica producido por *H Pylori* puede modificar aun más los carcinógenos externos o internos a este nivel. La transformación de Nitritos ( $\text{NO}_2$ ) en NO produce Trióxido de Dinitrógeno ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) que forma Nitrosotioles y Nitrosaminas, compuestos ambos que están reconocidos como carcinógenos gástricos en modelos experimentales. Esta transformación es inhibida por la presencia de antioxidantes como el ácido ascórbico, lo que explicaría su papel preventivo del CG; de cualquier manera *H Pylori* interfiere con esta acción antioxidante del Ac ascórbico al disminuir la

concentración intragástrica del mismo (Correa P 1998, Mannick EE 1996, Felley Cp 2002, Pignatelli 2001).



## HISTOLOGÍA

Los adenocarcinomas suponen más del 95% de las neoplasias malignas del estómago, por ello nos referimos a ellos cuando, de manera genérica, hablamos de cáncer gástrico. Las neoplasias malignas del estómago pueden clasificarse de acuerdo a su aspecto macroscópico o a sus características histopatológicas microscópicas, existiendo diversas clasificaciones que vamos a desarrollar brevemente.

### CLASIFICACIONES MACROSCÓPICAS

Las 2 clasificaciones macroscópicas más ampliamente utilizadas son la Clasificación de Borrmann (Borrmann 1926) en los casos de neoplasias avanzadas y, para los adenocarcinomas confinados a la mucosa o submucosa, la clasificación del Cáncer Gástrico Precoz desarrollada por la Sociedad Japonesa de Gastroenterología Endoscópica (EGC-JGES) (Hirota T 1993, Murakami T 1971).

---

#### CLASIFICACIÓN DE BORRMANN.

De acuerdo a esta clasificación los tumores gástricos se dividen en cuatro tipos fundamentales de acuerdo a su apariencia macroscópica (figura 1):

- **Tipo I. Polipoide:** Tumores polipoides bien circunscritos
- **Tipo II. Fungoide.** Tumores polipoides con una marcada infiltración central.

- **Tipo III. Ulcerados.** Tumores ulcerados con márgenes infiltrativos.
- **Tipo IV. Infiltrativos.** Tumores que se extienden superficialmente en la mucosa y submucosa produciendo una lesión plana con o sin ulceración que, en los casos más extensos se denomina linitis plástica o estómago en “Bota de cuero”.

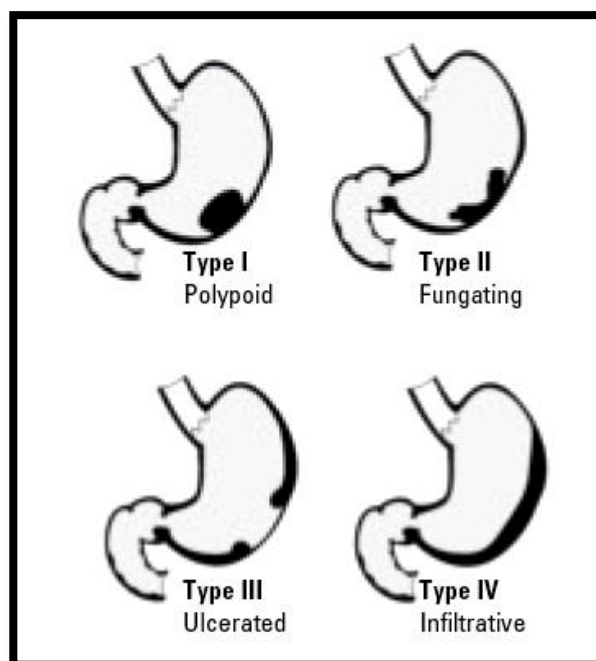


Figura 1. Clasificación de Borrmann

## EGC-JGES

El término Cáncer Gástrico Precoz (**EGC**) se originó en Japón y se refiere a los adenocarcinomas cuyo crecimiento está confinado a la mucosa y submucosa gástrica, independientemente de la presencia o no de metástasis en los ganglios linfáticos locoregionales. Los casos de EGC se clasifican según la apariencia macroscópica del tumor en la visión endoscópica en 3 tipos principales (figura 2):

- **Tipo I. Polipoide.** El tumor protruye más de 0.5 cm sobre la superficie de la mucosa gástrica.
- **Tipo II. Superficial.**
  - IIa. Elevado. Elevación plana de la mucosa, inferior a 0.5 cm de altura.
  - IIb. Plano. Mínima o no elevación en la altura de la mucosa.
  - IIc. Deprimido. Erosión superficial y/o ligeramente deprimido.

- **Tipo III. Excavado.** Depresión prominente, caracterizada por una excavación de tipo ulcerosa.

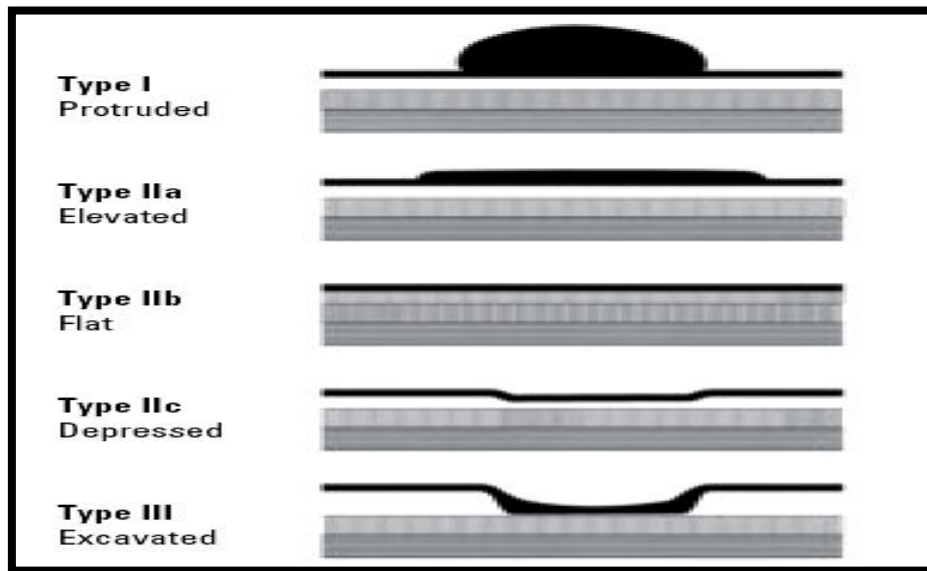


Figura 2 Clasificación del EGC-JGES

Ambas clasificaciones tienen, además de su función clasificatoria, un valor pronóstico evidente que se detalla en el capítulo correspondiente a los factores pronósticos del cáncer gástrico.

## CLASIFICACIONES MICROSCÓPICAS

Microscópicamente los adenocarcinomas gástricos pueden presentar diversos patrones histológicos. Aunque existen múltiples clasificaciones propuestas como por ejemplo las de [Ming Sc 1977](#), [Carneiro F 1997](#) y [Goseki N 1992](#), las 2 aceptadas y utilizadas de manera universal son la clasificación de la OMS y la Clasificación de Lauren.

### OMS

En la tabla 1 se detallan todos los tipos histológicos incluidos en la última edición de esta clasificación ([World Health Organization 2000](#)).

**Tabla 1. Clasificación de la OMS de las neoplasias gástricas**

Epithelial tumours		Non-epithelial tumours	
Intraepithelial neoplasia – Adenoma	8140/0 <sup>1</sup>	Leiomyoma	8890/0
Carcinoma		Schwannoma	9560/0
Adenocarcinoma	8140/3	Granular cell tumour	9580/0
intestinal type	8144/3	Glomus tumour	8711/0
diffuse type	8145/3	Leiomyosarcoma	8890/3
Papillary adenocarcinoma	8260/3	GI stromal tumour	8936/1
Tubular adenocarcinoma	8211/3	benign	8936/0
Mucinous adenocarcinoma	8480/3	uncertain malignant potential	8936/1
Signet-ring cell carcinoma	8490/3	malignant	8936/3
Adenosquamous carcinoma	8560/3	Kaposi sarcoma	9140/3
Squamous cell carcinoma	8070/3	Others	
Small cell carcinoma	8041/3		
Undifferentiated carcinoma	8020/3	Malignant lymphomas	
Others		Marginal zone B-cell lymphoma of MALT-type	9699/3
Carcinoid (well differentiated endocrine neoplasm)	8240/3	Mantle cell lymphoma	9673/3
		Diffuse large B-cell lymphoma	9680/3
		Others	
		Secondary tumours	

Las neoplasias malignas epiteliales se subdividen de acuerdo con esta clasificación en:

- Adenocarcinoma:
- Tipo Intestinal
- Tipo Difuso
- Adenocarcinoma papilar.
- Adenocarcinoma tubular.
- Adenocarcinoma mucinoso.
- Adenocarcinoma de células en anillo de sello
- Carcinoma adenoescamoso.
- Carcinoma de células escamosas
- Carcinoma de células pequeñas
- Carcinoma indiferenciado
- Otros

A pesar de una variabilidad histológica importante, en la mayoría de los tumores predomina uno de cuatro patrones principales, siendo el diagnóstico realizado en base a este patrón histológico predominante. Estos cuatro patrones dominantes serían:

- **Adenocarcinoma Tubular:** contiene túbulos dilatados de manera prominente que varían en su diámetro pudiendo presentar estructuras acinares. Las células tumorales pueden ser columnares, cuboideas o aplanadas por mucina intraluminal. Pueden detectarse también células claras. Entre las variantes de este tipo histológico se encuentra el Carcinoma Sólido, variante pobremente diferenciada y el Carcinoma Medular caracterizado por un prominente estroma linfóide.
- **Adenocarcinoma Papilar:** son tumores exofíticos bien diferenciados con procesos papilares/digitales alargados y recubiertos de células cilíndricas o cuboideas unidas a una matriz de tejido conectivo fibrovascular. Algunos de estos tumores pueden mostrar diferenciación

tubular o, más raramente, una arquitectura micropapilar. Característicamente el borde tumoral suele estar bien delimitado de las estructuras adyacentes y el propio tumor puede estar infiltrado de manera aguda o crónica por células inflamatorias.

- **Adenocarcinomas Mucinosos.** También denominados Carcinomas coloides. Por definición el 50% de estos tumores contienen lagos de mucina extracelular. Dos tipos de crecimiento fundamental pueden verse: glándulas delimitadas por un epitelio columnar secretor de mucina, o cadenas o acúmulos de células flotando en lagos de mucina. Ocasionalmente pueden verse células en anillo de sello que no son predominantes en la muestra.
- **Carcinomas de Células en Anillo de Sello.** Más del 50% del tumor está formado por células aisladas o pequeños grupos de células que contienen mucina intracitoplasmática. Estas células tumorales pueden tener 5 morfologías diferentes:
  - a) Núcleo desplazado hacia la membrana celular provocando la clásica apariencia en anillo de sello debido a un citoplasma globoide y ópticamente claro. Este citoplasma contiene mucina ácida que se tiñe con Azul Alcian a un pH 2.5,
  - b) células tumorales con núcleo central que asemejan histiocitos con escasa o nula actividad mitótica,
  - c) células pequeñas profundamente eosinófilas con pequeños pero prominentes citoplasmas granulares que contienen mucina neutra,

- d) células pequeñas con escasa o sin mucina, e) células anaplásicas con escasa o nula presencia de mucina.

Estos 5 tipos celulares se entremezclan unos con otros en diversas proporciones en el seno del tumor. Asimismo los tumores de células en anillo de sello pueden presentar un patrón glandular trabecular junto a zonas de infiltración sólida y difusa. Los carcinomas de células en anillo de sello son por definición infiltrantes, con una relativamente pequeña proporción de células malignas y abundante desmoplasia. Diversas tinciones pueden ayudar en su diagnóstico como son las de PAS, Mucicarmín o Azul Alcian. Asimismo las técnicas inmunohistoquímicas basadas en anticuerpos anticitoqueratinas permiten identificar células tumorales aisladas y diseminadas de manera irregular en el estroma tumoral, consiguiendo detectar un mayor porcentaje de células malignas que las tinciones de mucina clásicas.

---

## LAURÉN

La Clasificación de Laurén fue propuesta por este autor francés en 1965 (Laurén P 1965), habiendo demostrado desde entonces su utilidad diagnóstica, en especial en lo referente a poder diferenciar dos tipos tumorales con distintas características clínico-patológicas, etiologías, incidencias y lesiones precursoras.

En esta clasificación los adenocarcinomas gástricos se dividen en 2 tipos principales: intestinales o difusos. Aquellos casos que contienen una proporción similar de ambos tipos histológicos son denominados adenocarcinomas mixtos. Por el contrario, los casos demasiado indiferenciados para ser incluidos en una

u otra categoría son clasificados como Indeterminados. Estas 2 últimas categorías suponen aproximadamente un 16% de los casos.

- **Carcinomas Intestinales.** Estos tumores se caracterizan por formar estructuras glandulares de diferente grado de diferenciación, ocasionalmente pobremente diferenciadas en el borde de avance del tumor. Aparecen de manera habitual en el seno de mucosas con metaplasia intestinal. Suelen diseminarse principalmente por vía hematógena, siendo las metástasis hepáticas las más frecuentes.
- **Carcinomas Difusos.** Están constituidos por células neoplásicas pobremente cohesionadas que infiltran la pared gástrica de manera difusa con escasa o nula formación de glándulas. La apariencia de las células suele ser redonda y pequeña, dispuestas de manera aislada o en pequeños acúmulos que simulan glándulas o retículos. Estos tumores difusos pueden presentar pequeñas cantidades de mucina intersticial y se asemejan a los clasificados como Tumores de Células en Anillo de Sello de la clasificación de la OMS. La tasa mitótica de los tumores difusos es inferior a la que presentan los tumores de tipo intestinal, así como es menos evidente la inflamación asociada. Por el contrario, el grado de desmoplasia es mayor en este tipo tumoral. Al contrario que los carcinomas de tipo intestinal, suelen extenderse por la superficie peritoneal en forma de carcinomatosis.

Finalmente existen otros tipos de tumores malignos del estómago que suponen variantes raras y de escasa incidencia. Entre estos podemos incluir los carcinomas adenoescamosos, los carcinomas indiferenciados, los carcinomas



mixtos adenocarcinoma-carcinoide, los carcinomas de células pequeñas, los carcinomas de células parietales, coriocarcinomas, tumores del seno endodérmico, carcinomas embrionarios, tumores de células de Paneth y adenocarcinomas hepatoides.

## ESTADIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN.

Los adenocarcinomas gástricos pueden clasificarse de acuerdo a múltiples criterios: morfológicos, topográficos, pronósticos, etc....En la práctica médica actual la clasificación de estos tumores se realiza de acuerdo a factores directamente implicados en la toma de decisiones terapéuticas por lo cual sólo se utilizan:

### ESTADIFICACION O CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA,

Descrita en el capítulo dedicado a la histología del cáncer gástrico

### ESTADIFICACION TOPOGRÁFICA.

Divide los carcinomas gástricos según su localización en proximales o distales (Antonioli DA 1982). Esta división se basa no sólo en diferentes factores etiológicos y epidemiológicos, sino también en el diferente tratamiento quirúrgico indicado.

- Proximales o de la Unión Esofagogástrica (UGE). Incluyen los adenocarcinomas que engloban la UGE, independientemente de la localización de la masa tumoral; los adenocarcinomas localizados por debajo de la UGE y anteriormente considerados adenocarcinomas de cardias.
- Distales a la UGE. Incluye todos los carcinomas que asientan en cuerpo, antro o píloro.

## ESTADIFICIACION TNM.

Esta clasificación categoriza los adenocarcinomas gástricos en cuatro estadios (I, II, III, IV) de acuerdo a la extensión del tumor primario (T), la existencia de metástasis ganglionares y su número (N) y la presencia o no de metástasis a distancia. Esta clasificación está realizada y revisada periódicamente por la American Joint Committee on Cancer (AJCC) y la International Union Against Cancer (UICC), habiéndose utilizado hasta el año 2010 la revisión publicada en 2002 (Green FL 2002, UICC 2002) y desde el 1 de Enero de este año una nueva revisión con ciertas diferencias en la estadificación ganglionar fundamentalmente. (Edge S.B 2010, UICC 2010).

La aceptación universal de esta clasificación viene justificada por su capacidad de dividir de manera fiable los carcinomas gástricos en grupos según su pronóstico, así como por la facilidad de su empleo y reproducibilidad de los resultados. Las tablas 2 y 3 resumen los diferentes estadios de acuerdo a esta clasificación y las modificaciones introducidas en la nueva edición 2009.

El empleo de sufijos permite determinar si el estadio TNM se basa en los resultados obtenidos en la pieza quirúrgica (pTNM), si se trata de un estadificación clínica (cTNM), ecográfica (uTNM) o incluso si es la realizada tras recibir el paciente tratamiento quimio y/o radioterápico (ypTNM).

## CLASIFICACIÓN JAPONESA.

Desarrollada inicialmente por cirujanos japoneses para estandarizar el abordaje quirúrgico y la linfadenectomía empleada, ha sufrido diversas revisiones que incluyen aspectos endoscópicos, quirúrgicos y patológicos (Japanese Gastric Cancer Association 1998, Sasako M 1995). Similar a la clasificación TNM sus principales diferencias son:

Utiliza 4 categorías diagnósticas: clínica, quirúrgica, patológica y definitiva o final. La descripción de la afectación ganglionar requiere una meticulosa evaluación topográfica con muestreo biopsico de 16 estaciones ganglionares divididas en 3 grupos de acuerdo a la localización del tumor primario.

Diferencia como categorías distintas los casos de metástasis hepáticas, peritoneales o a distancia, basándose en el pronóstico peor de los pacientes con afectación metastásica hepática o peritoneal frente a otras localizaciones (pulmón, hueso...)

La tabla 4 muestra la estadificación del carcinoma gástrico de acuerdo a esta clasificación.

Tabla 2. Clasificación TNM del Cáncer Gástrico 6ª edición (2002)

Definition of Tumor, Nodes, Metastasis			
<b>PRIMARY TUMOR (T)</b>			
TX	Primary tumor cannot be assessed		
T0	No evidence of primary tumor		
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : intraepithelial tumor without invasion of the lamina propria		
T1	Tumor invades lamina propria or submucosa		
T2	Tumor invades muscularis propria or subserosa		
T2a	Tumor invades muscularis propria		
T2b	Tumor invades subserosa		
T3	Tumor penetrates serosal (visceral peritoneum) without invasion of adjacent structures		
T4	Tumor invades adjacent structures		
<b>REGIONAL LYMPH NODES (N)</b>			
NX	Regional lymph node(s) cannot be assessed		
N0	No regional lymph node metastasis		
N1	Metastasis in 1 to 6 regional lymph nodes		
N2	Metastasis in 7 to 15 regional lymph nodes		
N3	Metastases in more than 15 regional lymph nodes		
<b>DISTANT METASTASIS (M)</b>			
MX	Presence of distant metastasis cannot be assessed		
M0	No distant metastasis		
M1	Distant metastasis		
<b>STAGE GROUPING</b>			
O	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T1	N1	M0
	T2a/b	N0	M0
	T1	N2	M0
II	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
	T2a/b	N2	M0
IIIA	T3	N1	M0
	T4	N0	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N1-3	M0
IV	T1-3	N3	M0
	Any T	Any N	M1

Tabla 3. Modificaciones en la Clasificación TN 7ª edición

T1	Lamina propria, submucosa	Stage IA	T1	N0
T1a	Lamina propria	Stage IB	T2	N0
T1b	Submucosa		T1	N1
T2	Muscularis propria	Stage IIA	T3	N0
T3	Subserosa <span>Antes T2</span>		T2	N1
T4a	Perforates serosa <span>Antes T3</span>		T1	N2
T4b	Adjacent structures	Stage IIB	T4a	N0
			T3	N1
N1	1 to 2 nodes		T2	N2
N2	3 to 6 nodes <span>Antes N1</span>		T1	N3
N3a	7 - 15 nodes <span>Antes N2</span>	Stage IIIA	T4a	N1
N3b	16 or more <span>Antes N3</span>		T3	N2
			T2	N3
		Stages IIIB, IIIC, IV...		

Tabla 4 . Clasificación Japonesa del cáncer gástrico

<b>TUMOR STAGE</b>				
T1	Tumor invasion of mucosa and/or muscularis mucosa (M) or submucosa (SM)			
T2	Tumor invasion of muscularis propria (MP) or subserosa (SS)			
T3	Tumor penetration of serosal (SE)			
T4	Tumor invasion of adjacent structures (SI)			
TX	Unknown			
<b>NODAL STAGE</b>				
N0	No evidence of lymph node metastasis			
N1	Metastasis to group 1 lymph nodes, but no metastasis to groups 2 to 3 lymph nodes			
N2	Metastasis to group 2 lymph nodes, but no metastasis to group 3 lymph nodes			
N3	Metastasis to group 3 lymph nodes			
NX	Unknown			
<b>HEPATIC METASTASIS</b>				
<b>STAGE (H)</b>				
H0	No liver metastasis			
H1	Liver metastasis			
HX	Unknown			
<b>PERITONEAL METASTASIS</b>				
<b>STAGE (P)</b>				
P0	No peritoneal metastasis			
P1	Peritoneal metastasis			
PX	Unknown			
<b>PERITONEAL CYTOLOGY</b>				
<b>STAGE (CY)</b>				
CY0	Benign/indeterminate cells on peritoneal cytology <sup>a</sup>			
CY1	Cancer cells on peritoneal cytology			
CYX	Peritoneal cytology was not performed			
<b>OTHER DISTANT METASTASIS (M)</b>				
M0	No other distant metastases (although peritoneal, liver, or cytological metastases may be present)			
M1	Distant metastases other than the peritoneal, liver, or cytological metastases			
MX	Unknown			
<hr/>				
<b>STAGE GROUPING</b>				
	<b>N0</b>	<b>N1</b>	<b>N2</b>	<b>N3</b>
T1	IA	IB	II	
T2	IB	II	IIIA	
T3	II	IIIA	IIIB	IV
T4	IIIA	IIIB		
H1, P1, CY1, M1				

## FACTORES PRONÓSTICOS EN CÁNCER GÁSTRICO

Se consideran factores o marcadores pronósticos en oncología todas aquellas variables biológicas, histopatológicas o moleculares que influyen en la evolución de la enfermedad neoplásica, determinando la historia natural de la misma en ausencia de cualquier tratamiento. Este concepto se aplica de manera habitual a aquellas características que nos ayudan a seleccionar qué pacientes tratar y en qué momento en la evolución de su enfermedad. El pronóstico global de los pacientes afectados de cáncer gástrico es hoy en día pobre, con una supervivencia global a los 5 años inferior al 30%. Por ello es fundamental el conocimiento de aquellos factores que nos permitan detectar qué pacientes presentan un peor pronóstico de acuerdo a sus determinadas características biológicas.

### FACTORES CLINICO-PATOLÓGICOS

**FACTORES RELACIONADOS CON EL PACIENTE.** A pesar de la existencia de estudios iniciales que les asignaban cierto valor, ni el sexo, ni la edad, ni la duración de los síntomas antes del diagnóstico tumoral poseen un valor como marcadores pronósticos independientes. Por el contrario, el estado nutricional deteriorado y el estado inmunitario deficiente sí parecen poseer un carácter de mal pronóstico (Lo SS 1999, Maguire A 1996, Maehara Y 1992).

**TIPO HISTOLÓGICO.** Los diferentes tipos histológicos catalogados de acuerdo con la Clasificación de la OMS no han demostrado, en los análisis multivariantes realizados, poseer *per se* ningún valor pronóstico independiente del estadio tumoral correspondiente en cada caso. La única excepción la

constituyen el infrecuente carcinoma de células pequeñas, variedad tumoral de pronóstico infausto en todos los casos (van Krieken 2001). Por el contrario la Clasificación de Laurén sí tiene un carácter pronóstico, teniendo los tumores de tipo difuso una supervivencia notablemente inferior en cada estadio en comparación con los de tipo intestinal o indeterminado de acuerdo a esta misma clasificación.

**ASPECTO MACROSCÓPICO.** La clasificación en 4 subtipos tumorales de acuerdo a lo descrito por Borrmann ha demostrado en algunos estudios tener valor pronóstico, correspondiendo el mejor resultado a los tumores de tipo I y II (polípidos y polipoides con infiltración central) frente a los tipo III y IV (ulcerados e infiltrantes). Este valor pronóstico del aspecto tumoral macroscópico no ha podido ser confirmado en otros estudios (Bunt AM 1995).

**GRADO DE DIFERENCIACIÓN HISTOLÓGICA.** La clasificación de los adenocarcinomas gástricos de acuerdo a su grado de diferenciación glandular en bien (I), moderada (II), pobremente diferenciados (III) e indiferenciados (IV), ha demostrado ser un adecuado factor pronóstico, presentando los pacientes peor supervivencia conforme más indiferenciado es el tumor (Grado I 48% vivos a los 5 años del diagnóstico, grado IV 10%) (Carriaga MT 1995).

**LOCALIZACIÓN TUMORAL.** La localización del tumor primario ha demostrado ser un factor pronóstico independiente en los estudios de cáncer gástrico, siendo los tumores proximales los de peor pronóstico. Ello puede deberse a factores relacionados con dicha localización como son la incidencia mayor de diseminación ganglionar al diagnóstico o la tasa menor de



resecabilidad de los tumores de cardias y unión gastro-esofágica frente a los del estómago distal (cuerpo y antro) (Bunt AM 1995).

**INVASIÓN LINFÁTICA, VASCULAR Y PERINEURAL (ILVN).** Los resultados de 2 grandes estudios en pacientes intervenidos quirúrgicamente por cáncer gástrico han confirmado el carácter pronóstico independiente de estas tres características patológicas. En un primer estudio con 734 casos (Scartozzi M 2006) aquellos pacientes cuyo estudio patológico reveló ILVN tuvieron una supervivencia global y libre de progresión estadísticamente inferior al grupo de enfermos sin estas características de invasividad (45,5 meses de supervivencia global frente a mediana no alcanzada en el grupo sin infiltración, p 0.0001). Este mismo carácter de mal pronóstico se ha confirmado cuando se restringe el análisis a los casos considerados cáncer gástrico precoz y estadios I, lo que permitiría seleccionar una población de mayor riesgo de recaída y peor pronóstico, susceptible por tanto de un tratamiento adyuvante. Un segundo trabajo realizado en pacientes operados y con ausencia de afectación ganglionar locoregional en el examen anatomopatológico ha demostrado la relación directa entre la presencia de ILVN y la existencia de micrometástasis en los ganglios linfáticos locoregionales (Kim JJ 2008).

**LINFOCITOS INFILTRANTES DEL TUMOR (TIL).** En un estudio recientemente publicado (Lee HE 2008) se determinó en 22 muestras de cáncer gástrico la densidad de TIL en el tumor empleando como marcadores inmunohistoquímicos CD3, CD8, CD20 y CD45R0. Los grupos que presentaban una densidad alta de CD3, CD20 CD45R0 presentaban una supervivencia mayor que los grupos correspondientes con densidad baja,

confiriendo a la densidad de TIL el carácter de marcador pronóstico de supervivencia en cáncer gástrico.

**ESTADIO PATOLÓGICO.** El grado de infiltración del tumor en la pared y la existencia de metástasis ganglionares locoregionales son los factores pronósticos más reconocidos y forman la base de todos los sistemas de estadificación recientes en esta enfermedad. La relación directa entre la infiltración del tumor en la pared gástrica (T en la clasificación TNM) y la supervivencia del paciente está demostrada en diversos estudios europeos, americanos y japoneses que confirman el pronóstico peor de la enfermedad conforme mayor es la penetración tumoral (Alexander HR 1997). Asimismo la afectación ganglionar metastásica ha sido clásicamente otro de los factores pronósticos independientes más importantes. Hasta 1997 el estadio N de la Clasificación TNM era determinado en base a la localización anatómica de los ganglios linfáticos infiltrados por el tumor. A pesar de la relevancia pronóstica de este dato, la dificultad de su validación y su falta de reproducibilidad entre estudios motivó su sustitución en esa fecha por una clasificación basada en el número de ganglios afectados por el tumor (UICC 1997). Esta nueva categorización sigue siendo un marcador pronóstico válido e independiente, existiendo una relación directa entre el número de ganglios infiltrados y el pronóstico del paciente. De esta manera los enfermos sin evidencia de invasión ganglionar (N0) presentan índices de supervivencia del 80% a los 5 años del diagnóstico. Esta cifra que desciende al 35% en los casos N1 (1 a 6 ganglios afectados), al 15%-20% en los casos N2 (de 7 a 15 ganglios afectados) e incluso es inferior al 5% en los casos con infiltración tumoral más extensa N3. Estas diferencias son en todos los casos estadísticamente significativas.

Junto con el número total de ganglios afectos se ha descrito recientemente el valor pronóstico del Ratio de ganglios linfáticos metastásicos (número de ganglios infiltrados dividido por el número total de ganglios aislados). Este nuevo factor pronóstico parece ser tan importante como el número total de ganglios y más exacto a la hora de valorar la infiltración tumoral ganglionar en cada paciente (Takagane A 1999).

La existencia de metástasis hepáticas y/o de carcinomatosis peritoneal en el momento del diagnóstico constituyen dos factores de mal pronóstico incluso cuando se ajustan de acuerdo a otras variables como la realización o no de cirugía o el tipo histológico (Nishiyama M 1995, Maehara Y 2000).

NIVELES PREOPERATORIOS DEL ANTÍGENO CARCINOEMBRIÓNARIO (CEA). Los pacientes con niveles elevados de CEA en plasma obtenido antes de una intervención quirúrgica con intención curativa tienen un peor pronóstico que aquellos con niveles más bajos. Este factor permanece significativo cuando se analiza ajustado a otros marcadores pronósticos conocidos (Sakamoto J 1996, Maehara Y 1994).

FACTORES RELACIONADOS CON EL TRATAMIENTO. La persistencia tumoral tras una exéresis quirúrgica, bien en forma microscópica (resección R1) o macroscópica (resección R2); es un indicador de mal pronóstico independiente del resto de características clínico-patológicas. Los pacientes con cirugías incompletas presentan una supervivencia escasamente superior a la de los pacientes metastásicos desde el diagnóstico inicial (Hermanek P 1995). Algunos estudios han destacado la experiencia del cirujano y del centro en el que se lleva a cabo la gastrectomía como factores pronósticos

determinantes en cáncer gástrico. En estos trabajos se ha comprobado como la mortalidad operatoria desciende un 41% y el riesgo de muerte un 7% por cada incremento de 10 casos por año en la experiencia del cirujano (Bachmann MO 2002). Este carácter pronóstico de la experiencia del cirujano resulta significativo incluso cuando se analiza dentro de centros con amplia experiencia y un número elevado de casos por año (Birkmeyer JD 2003).

Como ejemplo y resumen podemos destacar un estudio japonés que ha revelado mediante análisis multivariante el carácter pronóstico de 10 variables clinicopatológicas: profundidad de invasión tumoral (T), infiltración linfática ganglionar (N), tipo de disección linfática empleada, tamaño tumoral, presencia de metástasis hepáticas, carcinomatosis peritoneal, invasión linfática, invasión perineural, tumor que ocupa toda la cavidad gástrica y tumor situado en el estómago medio (Maehara Y 2000).

## FACTORES PRONÓSTICOS MOLECULARES.

En las últimas décadas diversos estudios han destacado el papel que las alteraciones genéticas tienen en el desarrollo y progresión del cáncer gástrico (Becker KF 2000). El conocimiento de la patología molecular de esta neoplasia nos permite entender mejor la patogenia de la enfermedad y obtener marcadores pronósticos moleculares, algunos de los cuales tienen asimismo valor predictivo cuando se administra un tratamiento sistémico (Scartozzi M 2004).

**ALTERACIONES DE P53.** La sobreexpresión de p53 medida por inmunohistoquímica se ha documentado en un 17% – 91% de casos de cáncer gástrico invasivo. De manera complementaria las mutaciones en p53 se han reportado en un 0% a 77% de los casos. El papel de p53 como factor pronóstico en cáncer gástrico no está definitivamente establecido y los trabajos publicados presentan resultados contradictorios, habiéndose empleado técnicas, anticuerpos y métodos de interpretación distintos en cada serie (Tahare E 1996, Fonseca L 1994, Ichiyoshi Y 1997). La inducción de expresión de la proteína p21 por el gen p53 provoca un bloqueo del ciclo celular en la fase S mediante la fosforilación de kinasas dependientes de ciclinas. Esta relación ha sido estudiada como posible factor pronóstico en un estudio que concluyó como los pacientes con tumores sin sobreexpresión de p53 pero con expresión de p21 presentaban una mediana de supervivencia superior a los casos que sobreexpresan p53 y p21 simultáneamente (Okuyama T 2002).

**E-CADHERINA Y  $\beta$  CATENINA.** El gen CDH1 codifica la E-Cadherina, molécula esencial para mantener la adhesión intercelular en las células epiteliales. Su pérdida de expresión se ha demostrado en muchos tipos de neoplasias malignas incluyendo el cáncer gástrico, proponiéndose la metilación del promotor del gen CDH1 o un polimorfismo del mismo las causas de esta pérdida (Machado JC 2001). Se ha postulado la existencia de una relación inversa entre la expresión de E.Cadherina y el pronóstico, siendo este el más favorable en los casos de expresión normal de esta proteína junto con ausencia de expresión de MUC-1 (antígeno de mucina) (Tanaka M 2003). Asimismo se ha publicado un trabajo que muestra como, en cáncer gástrico, existe una expresión anormal de E-Cadherina y de  $\beta$ -Catenina en un 46% y 44% de casos

respectivamente, apareciendo más frecuentemente entre los casos de tipo histológico difuso de la clasificación de Lauren (Zhou YN 2002). De manera similar se ha demostrado una correlación significativa entre la expresión anormal de  $\beta$ -Catenina y la existencia de metástasis ganglionares. Ésta expresión alterada de E-Cadherina y de  $\beta$ -Catenina se encuentra en un 16% y 36% de los casos de displasia gástrica, sugiriendo que pueden ser eventos precoces en el proceso de tumorigénesis gástrica. La correlación entre la acumulación de  $\beta$ -Catenina y una pobre supervivencia la dan un carácter pronóstico que está pendiente de validación en serie más amplias de casos (Scartozzi 2004).

**INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES (MSI).** Este fenómeno aparece hasta en el 33% de casos de cáncer gástrico esporádico (Rhyu MG 1994). Aunque en esta neoplasia no se han demostrado mutaciones somáticas en los denominados Mismatch Repair Genes (MMR) como hMLH1 o hMSH2, los tumores gástricos con MSI presentan una pérdida de expresión de la proteína hMLH1 probablemente relacionada con una hipermetilación de la región del gen promotor de hMLH1 (Fleisher AS 1999). Los tumores gástricos con alta frecuencia de inestabilidad de microsatélites (MSI-H) presentan características clínico-patológicas diferenciadas como son una mayor frecuencia de localización antral, de subtipo histológico intestinal, de seropositividad para *H. Pylori* y una menor incidencia de metástasis ganglionares. (Wu MS 2000)

**RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGFR).** El Factor de Crecimiento Vascular Endotelial es uno de los reguladores principales de la angiogénesis y su receptor (VEGFR) se encuentra en la mayoría de las neoplasias humanas, donde actúa

promoviendo el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis por mecanismos paracrinos y autocrinos (Zhang H 2002). La detección de niveles elevados de VEGFR se ha correlacionado con una mayor agresividad tumoral. En el caso de los carcinomas gástricos se han relacionado la expresión de VEGF y de su receptor VEGFR con rasgos de mal pronóstico como son un estadio más avanzado al diagnóstico, un comportamiento más agresivo y un elevado índice de recidivas tras cirugía (Song ZJ 2002).

#### RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGFR).

El receptor del factor de crecimiento epidérmico determinado por inmunohistoquímica se encuentra sobreexpresado hasta en un 60% de los casos de cáncer gástrico y su sobreexpresión se relaciona con un estadio más avanzado al diagnóstico, con presencia de metástasis a distancia y una peor supervivencia (Galizia G 2007). Un reciente trabajo realizado sobre las piezas de gastrectomía de 511 pacientes intervenidos con intención curativa en un único centro durante el año 1995 ha mostrado con técnicas y medios estandarizados (IHQ test Dako, Carpinteria CA, USA; DualColour FISH con LSI EGFR Spectrum Orange/CEP 7 Spectrum Green, Vysis Downers Grove, IL, USA), una incidencia de sobreexpresión de EGFR medida por inmunohistoquímica del 27%, mientras la proporción de casos amplificados fue del 5,5% una vez excluidos los casos polisómicos. A pesar de existir una correlación estadística positiva entre la sobreexpresión medida por inmunohistoquímica y la amplificación génica del EGFR, el análisis multivariante solo pudo confirmar el carácter de mal pronóstico de la sobreexpresión del EGFR. (KIm MA 2008).

Otros factores moleculares que se han propuesto como factores con carácter pronóstico y relacionados con la patogenia molecular del cáncer gástrico son por ejemplo la expresión de p21, la densidad microvascular, las alteraciones de BAT-26, la sobreexpresión de la ciclina D2, los niveles del receptor soluble de IL-2 (SolIL-2R), del activador del plasminógeno tipo Urokinasa (uPA) y de algunos factores de proliferación como Ki67, o el antígeno de proliferación celular nuclear (PCNA).



## FACTORES PREDICTIVOS EN CÁNCER GÁSTRICO

Los factores o marcadores predictivos son aquellas variables genéticas, biológicas o moleculares que ayudan a predeterminar la posibilidad de obtener una respuesta a un tratamiento determinado. En muchos casos un mismo factor/marcador predictivo tiene también valor pronóstico en la enfermedad al correlacionar su presencia o ausencia con la respuesta terapéutica. En el cáncer gástrico se han identificado algunos de estos factores en relación con el tratamiento quimioterápico y, más recientemente, con el empleo de agentes dirigidos frente a dianas moleculares específicas.

**TIMIDILATO SINTETASA (TS).** Este es una de los enzimas clave en el control de la replicación del DNA y asimismo un objetivo de varios agentes antineoplásicos uno de los cuales es el 5 Fluorouracilo (5-Fu). Los datos preclínicos demostraron que la sobreexpresión de TS por las células tumorales determina la resistencia de las mismas al 5-Fu y a la Fluorodeoxyuridina (Longley DB 2003, Boku N 1998). A nivel clínico un estudio sobre 65 casos de cáncer gástrico tratado mediante quimioterapia neoadyuvante que incluía cisplatino y 5-Fu en infusión continua demostró una correlación entre los niveles de mRNA de TS y la respuesta al tratamiento; encontrándose como 15 de los 28 pacientes (54%) con escasa expresión tumoral de TS respondieron al tratamiento mientras sólo 5 de 29 casos (17%) con niveles elevados de expresión de TS tuvieron una respuesta objetiva (Lenz HJ 1996). Este trabajo ha sido corroborado posteriormente por otros dos estudios que determinaron TS por inmunohistoquímica y en pacientes que sólo recibieron 5-Fu en monoterapia, lo que elimina el posible sesgo por la interacción del cisplatino en

la serie inicialmente estudiada (Yeh KH 1998, Alexander HR 1995). La expresión de TS también se ha correlacionado con el pronóstico en pacientes sometidos a gastrectomías con intención curativa, adoptando entonces un carácter pronóstico y un posible papel a la hora de seleccionar los casos con indicación de tratamiento adyuvante (Suda Y 1999).

Recientemente se ha publicado también el carácter predictivo de la respuesta al tratamiento quimioterápido basado en 5-Fu de los niveles de Timidina Fosforilasa (TP) y Dihidripirimidina Dehidrogenasa (DPD.) (Hua D 2007).

#### RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGFR).

Además de su carácter pronóstico en cáncer gástrico, se ha estudiado la sobreexpresión de EGFR como posible factor predictivo de respuesta al tratamiento con fármacos dirigidos específicamente frente a esa vía. A pesar de los resultados negativos de los primeros ensayos clínicos que emplearon pequeñas moléculas dirigidas frente al dominio intracelular del EGFR (Erlotinib y Gefitinib), numerosos estudios siguen explorando el bloqueo de esta vía de señales mediante el empleo por ejemplo de Anticuerpos monoclonales dirigidos frente a la porción extracelular del receptor. Rojo F y Cols (Rojo F 2006) estudiaron por inmunohistoquímica la expresión de EGFR, pEGFR (la forma activada por fosforilación del receptor), pMAPK, pAKT y Ki67; en muestras obtenidas antes y después del tratamiento con Gefitinib. Encontraron expresión de EGFR en el 62,5% con una reducción significativa de los niveles de pEGFR tras el tratamiento con Gefitinib. A pesar de ello sólo se observó un descenso en la proliferación celular en los casos con niveles bajos de pAkt, lo que induce a pensar en el papel fundamental de la vía de Pi3K-Akt y su correlación con EGFR como regulador de la respuesta o resistencia a los inhibidores de EGFR.

**P53 Y ERCC1.** Los estudios del posible factor predictivo de la presencia de mutaciones en p53 o de su expresión inmunohistoquímica son contradictorios y se han obtenido de modo retrospectivo. Aunque algún estudio (Cascinu S 1998) muestra una relación entre la detección de p53 mutado y la resistencia al tratamiento quimioterápico, este hallazgo no ha sido confirmado en otros trabajos (Nakata B 1998, Ikeguchi M 1997). ERCC1 (Excision repair cross-complementing gene) es un enzima implicado en la reparación del DNA y se ha comunicado la correlación entre su expresión y la resistencia al tratamiento con Cisplatino, citostático cuyo mecanismo de acción fundamental es el daño en el DNA a través de la formación de aductos inter o intracatenarios; los pacientes con niveles de expresión más bajos presentaron mayor sensibilidad al tratamiento y una mayor supervivencia (Metzger R 1998).

El oncogén HER2 se ha estudiado asimismo como un factor pronóstico y predictivo en cáncer gástrico. Los resultados obtenidos y su significado se detallan en un apartado independiente al ser este oncogén el principal objeto de estudio de esta tesis.

## TRATAMIENTO DEL CÁNCER GÁSTRICO

El tratamiento con intención curativa del cáncer gástrico pasa inexorablemente por la resección quirúrgica del tumor primario y de los ganglios linfáticos locoregionales. En el éxito del tratamiento influirán no sólo la extensión de la enfermedad, sino también el tipo de cirugía practicada y la correcta selección de los pacientes. El tratamiento quimio o quimioradioterápico adyuvante (postoperatorio) es cada día más utilizado en la práctica clínica habitual aunque el tipo de tratamiento y el mejor esquema terapéutico siguen considerándose tema de investigación. El tratamiento neoadyuvante (preoperatorio) ha demostrado conseguir la reducción del tumor primario permitiendo resecciones potencialmente curativas en casos inicialmente de resecabilidad dudosa, sin comprometer por ello la supervivencia a largo plazo del paciente. Cuando la enfermedad es metastásica, y a pesar de que la quimioterapia ha demostrado mejorar la calidad de vida y la supervivencia de los pacientes, el tratamiento debe considerarse paliativo. En estos casos se emplean tanto quimioterapia y/o radioterapia con intención paliativa como cirugías destinadas a evitar complicaciones como el sangrado tumoral o la obstrucción.

## TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DEL CÁNCER GÁSTRICO

### TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DEL CÁNCER GÁSTRICO PRECOZ

En los casos de carcinomas gástricos precoces, esto es confinados a la mucosa o submucosa, el riesgo de afectación tumoral de los ganglios linfáticos locoregionales se considera bajo, especialmente en aquellos casos bien o moderadamente diferenciado, inferiores a 2 cm de diámetro y sin invasión de la

submucosa ni de los linfáticos y vasos en la biopsia diagnóstica. En estos casos la realización de una resección endoscópica de la mucosa se ha considerado el tratamiento de elección, especialmente en países con alta incidencia como Japón, en los últimos 15 años (Nakagima T 2002) . A pesar de la falta de estudios randomizados que comparen la resección endoscópica frente a cirugía abierta, una revisión exhaustiva de este procedimiento (Wang Yp 2006) ha demostrado su eficacia y seguridad, lográndose supervivencias libres de enfermedad superiores al 95 % a los 10 años, con tasas de recidivas locales inferiores al 6% y un perfil de complicaciones aceptables e inferiores a las que presenta la cirugía tradicional (0.6% perforaciones, 14% sangrado post-resección) (Kim JJ 2007).

Recientemente se he postulado la resección endoscópica submucosa como una técnica superior a la resección mucosa en términos de supervivencia libre de recidiva y posibilidad de resekar el tumor en un solo bloque (Gotoda T 2006), a pesar de un mayor riesgo de perforaciones iatrogénicas. Asimismo, un trabajo reciente en el que se analizaba la infiltración ganglionar locoregional en 5265 casos de cáncer gástrico tratados mediante gastrectomía con linfadenectomía radical (Gotoda T 2000), demostró que los pacientes con tumores bien diferenciados localizados en la mucosa o la submucosa gástrica de menos de 3 cm y los tumores intramucosos pobremente diferenciados de menos de 2 cm, tienen un riesgo muy pequeño de presentar metástasis ganglionares. A pesar de ello, hasta un 20% de los tumores limitados a la submucosa pueden presentar afectación ganglionar locoregional, por lo cual en el momento actual únicamente está aceptada la indicación de resección

endoscópica en aquellos tumores bien diferenciados y limitados a la mucosa (Yasuda K 1999).

---

## RESECCIÓN DEL TUMOR PRIMARIO

El tratamiento quirúrgico básico se centra en la realización de una gastrectomía total o subtotal, dependiendo fundamentalmente la elección de una u otra según la localización dentro del estómago del tumor primario y del tipo histológico (Maruyama K 1996). La gastrectomía total es el procedimiento recomendado en los casos de lesiones localizadas en el estómago proximal, en el tercio medio del mismo o en aquellos casos de tipo difuso en la Clasificación de Laurén.

En aquellos casos en que el tumor está localizado a nivel del estómago distal, la realización de una gastrectomía total no ha demostrado aportar ningún beneficio frente a la realización de gastrectomías subtotales. En este sentido 2 estudios randomizados europeos (Gouzi JL 2000, Bozzetti F 1999) que incluían más de 800 pacientes y publicados recientemente han concluido que la práctica de una gastrectomía subtotal logra una supervivencia global igual a la gastrectomía total, siendo notablemente menor la tasa de mortalidad operatoria (1% frente a 2%) y la tasa de complicaciones postquirúrgicas (9% frente a 13%). Basándose en estos estudios la gastrectomía subtotal se considera hoy en día la técnica quirúrgica de elección en aquellos casos de tumores localizados en el estómago distal.

En todos los casos se recomienda la realización del análisis patológico microscópico de los márgenes de resección. En aquellos tumores con lesiones de patrón infiltrativo se debe lograr un margen quirúrgico proximal libre de

tumor de 5 cm, pudiéndose reducirse este margen a 2 cm en los casos expansivos. A nivel distal el píloro parece actuar como una barrera natural y la infiltración del margen quirúrgico distal es excepcional, considerándose suficiente un margen de 2-3 cm (Nakajima T, 2002).

---

## LINFADENECTOMIA LOCOREGIONAL.

La extensión de la linfadenectomía locoregional necesaria en la extirpación de un adenocarcinoma gástrico ha sido y es hoy en día motivo de debate. Desde la categorización por el JCGC de los ganglios linfático regionales en 16 estaciones diferenciadas (Japanese Gastric Cancer Association 1998) (Figura 3), se han definido 4 tipos de linfadenectomías de acuerdo a los territorios extirpados:

- Linfadenectomía D1: resección de los ganglios localizados en las curvaturas mayor y menor gástricas (estaciones 1 a 6).
- Linfadenectomía D2: Resección D1 más exéresis de los ganglios a lo largo de la arteria gástrica izquierda, la arteria hepática común, el tronco celíaco, el hilio esplénico y la arteria esplénica (estaciones 7 a 11).
- Linfadenectomía D3: Resección D2 más exéresis de los ganglios situados en el ligamento hepatoduodenal (estación 12), la cara posterior de la cabeza de páncreas (estación 13) y la raíz del mesenterio (estación 14).
- Linfadenectomía D4: Resección D3 más linfadenectomía que incluye los ganglios paracólicos y paraaórticos.

La linfadenectomía D1 por tanto limita la exéresis a los ganglios del nivel N1 en la clasificación del JCGC, la linfadenectomía D2 incluye los niveles N1 y N2, y la linfadenectomía D3 abarca los niveles N1, N2 y N3.

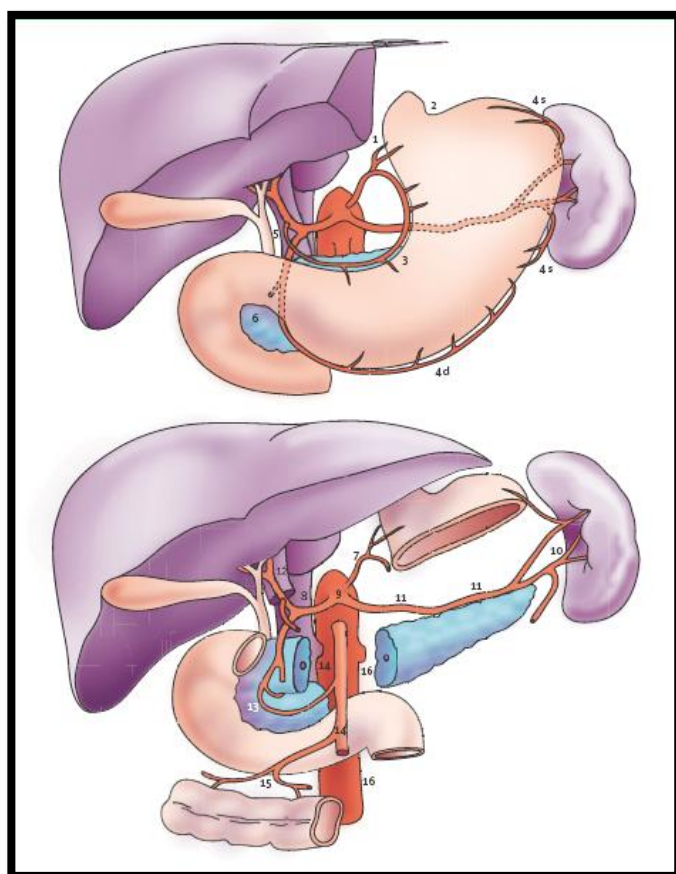
En Japón, y basándose en amplios estudios retrospectivos, el tratamiento quirúrgico considerado standard es la gastrectomía acompañada de linfadenectomía D2. Por el contrario, en los países occidentales sigue considerándose un tema controvertido su posible beneficio con respecto a la supervivencia del paciente. Esta controversia viene motivada por los resultados

negativos obtenidos en cuatro ensayos randomizados que comparaban específicamente el impacto en la supervivencia de los pacientes que eran sometidos a una linfadenectomía D2 frente a aquellos que se limitaba la linfadenectomía al primer nivel ganglionar.

Los dos primeros estudios fueron realizados por Dent y cols (Dent DM 1988) en Sudáfrica y por Robertson y cols (Robertson CS 1994) en Hong Kong. Dado su escaso tamaño

muestral, se consideraron

insuficientes y motivaron dos estudios amplios a nivel europeo. El primero fue realizado por el British Medical Research Council (MRC) (Cuschieri A 1996) e incluyó 400 pacientes con cáncer gástrico resecable. Randomizados entre



**Figura 3 Estaciones ganglionares locoregionales del estómago. Modificado de Haartgrink HH 2009.**



linfadenectomía D1 o D2, el grupo que fue sometido a la resección más amplia mostró una mayor mortalidad operatoria (13% vs 6.5%,  $p=0.04$ ) y mayores complicaciones postoperatorias (46% vs 28%  $p<.001$ ), sin obtener ningún beneficio en la supervivencia global (33% vs 35% HR 1.10 IC95%0.87 – 1.39). El segundo estudio fue llevado a cabo por el Grupo Holandés de Cáncer Gástrico (Bonenkamp JJ 1995) que incluyó 996 pacientes reclutados en 80 hospitales distintos. En este estudio, tanto la morbilidad como la mortalidad postoperatoria fueron superiores en el grupo de linfadenectomía D2 (43% vs 25%  $p<.001$  y 10% vs 4%  $p=0.004$  respectivamente. A pesar de un seguimiento extenso (11 años) (Hartgrink HH 2004), los resultados recientes de este estudio no han demostrado una mejoría en la supervivencia de los pacientes sometidos a linfadenectomía más extensa, aunque sí se ha observado un beneficio modesto en el subgrupo de pacientes con estadio II y IIIA según la clasificación TNM.

El origen de la controversia radica en que, a pesar de su mayor morbilidad y mortalidad en los estudios europeos, la linfadenectomía D2 permite lograr resecciones completas (R0) en aquellos casos con metástasis ganglionares en el segundo nivel (N2) y en los cuales una resección D1 sería insuficiente. La práctica de una linfadenectomía D2 es especialmente deseable si se tiene en cuenta que el 50% de los pacientes sometidos a este vaciamiento ganglionar amplio presentaban metástasis ganglionares en el nivel N2 que no se hubieran resacado con una linfadenectomía menos extensa (D1) (Roukos DH 1998, Roukos DH 1999). Por tanto, un porcentaje elevado de pacientes con afectación N2 pueden ser tratados quirúrgicamente con intención curativa sólo si se realiza una linfadenectomía extensa.

El análisis comparativo de la morbilidad y mortalidad entre ambos tipos de linfadenectomía en los diferentes estudios, ha permitido concluir que los excelentes resultados obtenidos en los centros japoneses (menos del 1% de mortalidad) solo son igualados en los países occidentales por cirujanos con amplia experiencia en este tipo de intervenciones. La falta de experiencia quirúrgica en el ensayo británico y la realización rutinaria de esplenopancreatectomías distales en el ensayo holandés se han considerado factores fundamentales que contribuyeron al incremento de la morbilidad y mortalidad de las linfadenectomías D2 y a los resultados negativos obtenidos en ambos estudios (Brennan MF 1999). Por ello, y a pesar de la falta de ensayos randomizados que apoyen la realización de linfadenectomías D2, la mayoría de los expertos considera como práctica estándar actual la realización de esta exéresis ganglionar, aunque se debe practicar únicamente en centros y por cirujanos con amplia experiencia.

#### PAPEL DE LA ESPLENECTOMÍA Y LA PANCREATECTOMÍA DISTAL

La práctica de una esplenectomía acompañando a la gastrectomía radical ha sido habitual en la mayoría de los hospitales dado que facilita en gran medida el abordaje de los linfáticos de la estación 10 (hilio esplénico). La incidencia de metástasis en dichos ganglios viene directamente relacionada con la invasión en profundidad del tumor en la pared gástrica y, sobre todo, con la localización del mismo. De este modo, la afectación ganglionar en hilio esplénico es rara (<2%) en los casos de tumores localizados en el estómago distal, frecuente (± 15%) en los tumores proximales y aparece hasta en un 20% de los tumores que infiltran todo el espesor de la pared gástrica.

El impacto de la esplenectomía en la morbilidad perioperatoria y la supervivencia de los pacientes es otro tema de controversia (Wanebo HJ 1997). Tanto el estudio del MRC como el del grupo holandés que compararon linfadenectomía D1 vs D2 mostraron un efecto negativo de la esplenectomía en la supervivencia de los pacientes. En ambos estudios la esplenectomía era parte obligada en la realización de la linfadenectomía. D2. Similares resultados se han obtenido del análisis retrospectivo de pacientes intervenidos en centros norteamericanos. Por el contrario 2 estudios randomizados (Csendes A 2002, Yu W 2006) realizados en Chile y Corea en los cuales se comparó directamente la realización de una gastrectomía total con o sin esplenectomía, no mostraron diferencias significativas en términos de supervivencia global o mortalidad postquirúrgica aunque la exéresis del bazo sí aumentó las complicaciones sépticas postoperatorias.

Por ello, aunque la esplenectomía sigue formando parte de la definición de una linfadenectomía D2 reglada, su práctica ha quedado limitada a aquellos casos en los que se evidencia un engrosamiento macroscópico de los ganglios linfáticos del hilo esplénico o una infiltración directa del tumor a través de la serosa en el bazo

Además de la realización de la esplenectomía, la pancreatectomía corporocaudal o distal permite asegurar una correcta exposición y limpieza de los linfáticos situados a lo largo de la arteria esplénica (estación 11). La práctica de la misma se demostró como un factor de riesgo de mayores complicaciones quirúrgicas en el estudio holandés antes mencionado y de mayor morbilidad y peor supervivencia en el estudio británico. Un análisis del subgrupo de pacientes de este último estudio que fueron sometidos a

linfadenectomía D2 sin esplenopancreatectomía mostró una supervivencia global superior al grupo que se sometió a linfadenectomía D1. Asimismo en 1998 el Grupo Italiano de Estudio del Cáncer gástrico publicó un ensayo clínico (Degiuli M 1998) en el que los pacientes eran sometidos a linfadenectomía D1 vs linfadenectomía D2 sin esplenopancreatectomía salvo en casos de invasión macroscópica del páncreas. El análisis de los 191 pacientes incluidos mostró una mortalidad del 3% y una tasa de complicaciones postoperatorias del 16%, cifras muy similares a las obtenidas en los estudios llevados a cabo en Japón por cirujanos con gran experiencia.

En el momento actual, se recomienda la realización de una linfadenectomía D2 sin pancreatectomía distal salvo en los casos de infiltración directa del páncreas a través de la serosa gástrica.

## TRATAMIENTO SISTÉMICO DEL CÁNCER GÁSTRICO

### TRATAMIENTO NEOADYUVANTE

En los países occidentales la mayoría de los pacientes son diagnosticados con tumores localmente avanzados. En estos casos la práctica de una cirugía completa con márgenes quirúrgicos libres (R0) es posible sólo en la mitad de los casos, con más de un 60% de recaídas tumorales en los 3 años siguientes a la cirugía (Rougier P 1994). En estos pacientes la administración de un tratamiento preoperatorio o neoadyuvante puede permitir la erradicación de metástasis ocultas (responsables del alto porcentaje de recidivas precoces a distancia) y la realización de cirugías completas con intención curativa en casos inicialmente no resecables o dudosos. Para ello es fundamental una

estadificación correcta preoperatoria que incluya la realización de Tomografía Axial Computerizada (TAC) torácica-abdominal y pélvica y una Ecoendoscopia que permita definir con exactitud la profundidad de la infiltración tumoral de la pared gástrica y la afectación o no de los ganglios linfáticos locoregionales.

Se han publicado múltiples estudios en fase II no randomizados de quimioterapia neoadyuvante en pacientes con cáncer gástrico operable, no evidenciándose un aumento en la morbilidad perioperatoria y lográndose tasas de resecciones R0 entre el 72% y el 87% (Leichman L 1992, Ajani JA 1993). Más recientemente se han presentado los resultados de cuatro estudios randomizados en este grupo de pacientes operables. Los dos primeros emplean tratamientos quimioterápicos obsoletos y sus resultados no son considerados actualmente aplicables. En los últimos 4 años, dos estudios con esquemas terapéuticos más modernos han sido presentados y sus resultados coinciden en mostrar el beneficio en la supervivencia global del tratamiento quimioterápico preoperatorio. En 2006 fue publicado el ensayo MAGIC (Cunningham D 2006) en el cual pacientes con adenocarcinoma gástrico o del tercio inferior esofágico operables eran aleatoriamente divididos entre ser intervenidos quirúrgicamente de entrada o recibir 3 ciclos de quimioterapia preoperatoria con Epirrubicina, Cisplatino y 5-Fu seguido de cirugía y 3 ciclos más del mismo esquema quimioterápico administrados postoperatoriamente. A pesar de que sólo un 42 % de los pacientes lograron recibir todo el tratamiento propuesto inicialmente y sólo el 86% de los pacientes que completaron la quimioterapia preoperatoria fueron capaces de completar asimismo el tratamiento postquirúrgico; el grupo asignado a recibir quimioterapia neoadyuvante logró un incremento clínico y estadísticamente significativo tanto

en términos de supervivencia global (porcentaje de vivos a los 5 años 36% vs 23% HR0.75 IC 95%0.6 - 0.9 p=0.009) como de supervivencia libre de enfermedad (HR 0.66 IC 95% 0.53 – 0.81 p=0.001). Asimismo la tasa de resecciones consideradas curativas (R0) fueron superiores en el grupo que recibió tratamiento preoperatorio (79.3% vs 70% p=0.03), sin evidenciarse ningún incremento en la morbilidad perioperatoria. Al año siguiente el grupo francés (Boige V 2007) presentó sus resultados con un estudio randomizado en el que los pacientes recibían 3 ciclos de Cisplatino y 5-Fu de manera preoperatoria frente a tratamiento quirúrgico solamente. Al igual que en el estudio MAGIC, la administración de quimioterapia preoperatoria logró un aumento significativo en la supervivencia global de los pacientes; (Supervivientes a los 5 años 38% vs 24%, HR 0.69 IC95% 0.5 – 0.95 p 0.02).

En los casos de adenocarcinomas gástricos irresecables de inicio (localmente avanzados), la administración de quimioterapia neoadyuvante logra tasas de resecabilidad entre el 40% y el 78% de acuerdo a lo publicado en múltiples ensayos no randomizados en fase II. Las diferencias en los esquemas terapéuticos administrados y en los medios diagnósticos empleados para considerar los casos como irresecables hacen imposible elaborar una conclusión válida de estos estudios. Dos pequeños ensayos randomizados (53 y 55 pacientes cada uno) (Kang YK 1996, Yonemura Y 1993) muestran resultados contradictorios en lo referente al impacto en la supervivencia del tratamiento neoadyuvante del cáncer gástrico localmente avanzado.

En el momento actual, y hasta la publicación de los estudios en marcha que incluyen nuevos agentes quimioterápicos (Taxanos, Irinotecan) o fármacos dirigidos frente a dianas moleculares específicas (Trastuzumab, Bevacizumab,

Cetuximab); el tratamiento perioperatorio con ECF (Epirubicina, Cisplatino, 5-Fu) debe considerarse la mejor opción de tratamiento en pacientes con cáncer gástrico operable y sin contraindicaciones para la administración del mismo

---

## TRATAMIENTO ADYUVANTE

---

### TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO ADYUVANTE

La necesidad de un tratamiento sistémico postoperatorio viene fundamentada en la estrecha relación entre la supervivencia de los pacientes y su estadio al diagnóstico. Mientras los pacientes con Cáncer Gástrico Precoz presentan tasas de curación del 80% sólo con tratamiento quirúrgico, los pacientes con tumores T3 N0 (estadio II) tienen una supervivencia inferior al 50% a los 5 años del diagnóstico y los casos de curación en pacientes con invasión ganglionar inicial son casi anecdóticos. Este pronóstico infausto hace obligada la búsqueda de algún tratamiento postoperatorio que mejore los resultados de la cirugía.

Durante las décadas de los años 80 y 90 en el pasado siglo XX se llevaron a cabo multitud de estudio clínicos usando diferentes fármacos y diferentes esquemas terapéuticos como por ejemplo Tiotepa, 5 Fluorodesoxiuridina, regímenes de combinación de 5-Fu y Nitrosureas, 5-Fu / Mitomicina C o 5-Fu y Antraciclinas. Los resultados de estos tratamientos fueron decepcionantes y solo en algunos de ellos se logro demostrar cierto beneficio en la supervivencia de los pacientes que recibían tratamiento postoperatorio (Imanaga H 1977, Grau JJ 1998, Neri B 1996). De cualquier manera el pequeño tamaño muestral de estos ensayos no permite considerar estos resultados como sólidos o

definitivos. Más recientemente, en el año 2007, se publicaron los resultados de 2 estudios italianos con resultados positivos pero sin alcanzar la significación estadística necesaria. En el primero de ellos (De Vita F 2007) los pacientes fueron randomizados a recibir únicamente tratamiento quirúrgico o bien tratamiento quirúrgico seguido de quimioterapia adyuvante con Epirrubicina, Leucovorin, 5-Fu y Etopósido. La supervivencia global a los 5 años fue del 48% en la rama de tratamiento adyuvante frente al 43.5% en la rama de tratamiento exclusivamente quirúrgico. A pesar de ello este incremento en la supervivencia del 4.5% no fue estadísticamente significativo ( $p=0.610$ ). En el segundo estudio publicado ese mismo año, el Grupo Italiano para el Estudio del Cancer del Tracto Digestivo (GISCAD) (Constanzo F 2008) presentó los resultados de un ensayo clínico en el que los pacientes, tras la cirugía inicial con intención curativa, eran aleatorizados a recibir un régimen de quimioterapia intensivo (PELF semanal, Cisplatino, epirrubicina, leucovorin y 5-Fu) ó 5-Fu/Leucovorin. En este caso todos los pacientes recibían algún tipo de tratamiento postoperatorio. Se incluyeron 400 pacientes y la supervivencia global a los 5 años fue del 52% en la rama de tratamiento intensivo frente al 50% del grupo que recibía 5-Fu/Leucovorin; diferencia no estadísticamente significativa. Es de destacar que sólo un 9.4% de los pacientes que recibieron tratamiento intensivo (PELF semanal) y un 43% de los que reciben 5-Fu/Leucovorin fueron capaces de completar el tratamiento programado inicialmente, confirmando los datos obtenidos en estudio anteriores con respecto al pobre cumplimiento terapéutico de estos esquemas postoperatorios. Por ello la tasa alta de supervivientes a los 5 años en ambos grupos (50%) parece deberse al elevado



porcentaje de resecciones con linfadenectomías D1 o D2 (más del 75% de los pacientes).

Otros estudios europeos han buscado incorporar el Cisplatino a regímenes basados en 5 Fluorouracilo dentro de ensayos fase III. Entre estos podemos destacar el estudio del grupo francés (Bouché O 2005) que incluyó 260 pacientes randomizados a recibir o no cisplatino y 5-Fu tras la cirugía. Tras un seguimiento medio de más de 7 años no se demostró ningún beneficio con el empleo de quimioterapia adyuvante. Asimismo Bajetta y cols (Bajetta E 2002) publicaron los resultados del grupo italiano que empleaba como esquema adyuvante un esquema mixto consistente en 2 ciclos de EAP (Etopósido, Cisplatino y Doxorubicina) seguido de 2 ciclos de 5-Fu y Leucovorin. A pesar del resultado globalmente negativo del estudio, se pudo apreciar cierto beneficio en términos de supervivencia en aquellos pacientes con más de 6 ganglios infiltrados en el examen patológico de la pieza quirúrgica.

Al contrario de lo ocurrido con los estudios europeos de quimioterapia adyuvante tras cirugía del cáncer gástrico, un estudio japonés (Sakumaroto S 2007) ha logrado un impacto positivo en la supervivencia con el uso de un derivado fluoropirimidínico de 4ª generación: S-1. Tras demostrar su actividad antitumoral en los casos de cáncer gástrico avanzado, se llevó a cabo un ensayo clínico incluyendo 1059 pacientes sometidos a cirugía con intención curativa y linfadenectomía D2. Los participantes fueron randomizados a cirugía sola versus cirugía seguida de S-1 en monoterapia durante 1 año. Los datos finales mostraron un incremento estadísticamente significativo en la supervivencia global a los 3 años a favor del grupo que recibía S-1 (80.1% vs 70.1%, HR0.69 IC95% 0.52-0.87, p=0.003). Además el cumplimiento

terapéutico (65.8%) fue notablemente superior a lo publicado en anteriores estudios, por lo que los autores recomiendan el empleo de S-1 como terapia adyuvante tras resección curativa de una neoplasia gástrica mediante linfadenectomía D2. Este esquema terapéutico es de hecho el estándar actual de tratamiento en el país nipón.

Ante la falta de estudios randomizados concluyentes del uso de quimioterapia adyuvante en cáncer gástrico, se han publicado 6 metaanálisis (Hermans J 1993, Earle CC 1999, Mari E 2000, Panzini I 2002, Hu JK 2002, Janunger KG 2002) que incluyen la mayoría de los estudios realizados. En 5 de estos trabajos se demuestra un efecto positivo del tratamiento quimioterápico adyuvante con un modesto pero estadísticamente significativo beneficio en la supervivencia de aquellos pacientes que reciben tratamiento postoperatorio. Asimismo este beneficio parece ser mayor, pero no exclusivo, en los pacientes con afectación ganglionar tumoral en la pieza quirúrgica.

---

## TRATAMIENTO QUIMIORADIOTERÁPICO ADYUVANTE

Dos estudios randomizados de radioterapia adyuvante han sido publicados hasta la fecha y ambos con resultados negativos (Halissey MT 1994, Krämling HJ 1996). Esta falta de eficacia se ha tratado de mejorar con el empleo de tratamientos postoperatorios que incluyan quimioterapia y radioterapia administradas de manera concomitante. Dos estudios iniciales (Dent DM 1979, Moertel CG 1984) demostraron un beneficio en la supervivencia de los pacientes aunque el número pequeño de pacientes incluidos en los mismos limita la interpretación positiva de estos resultados.

En el año 2001 el Southwest Oncology Group (SWOG) publicó los resultados de su estudio INT 1116 (McDonald JS 2001). En este ensayo clínico 556 pacientes sometidos a una resección potencialmente curativa de su neoplasia gástrica eran randomizados a seguimiento exhaustivo frente a tratamiento quimioradioterápico adyuvante basado en 5-Fu y hasta alcanzar una dosis radioterápica total de 45Gy. Tras un seguimiento medio de 5 años el grupo que recibió tratamiento quimioradioterápico adyuvante logró un aumento de la supervivencia global a los 5 años del 11.6% (40% vs 28.4%  $p=0.001$ ), así como un incremento en la supervivencia libre de recaída en el mismo periodo (25% vs 31%  $p=0.001$ ). Estos resultados llevan a los autores a concluir que el tratamiento quimioradioterápico concomitante postoperatorio debe considerarse, y así lo es en los EUU, el tratamiento estándar en los pacientes intervenidos con intención curativa por un cáncer gástrico. Aunque la discusión de este trabajo en extenso no es objetivo de esta tesis, debemos destacar que diversos problemas metodológicos han llevado a cuestionar en Europa y Asia la validez de estas conclusiones. Entre ellos los más discutidos son el escaso número de pacientes que fueron sometidos a gastrectomía con una linfadenectomía adecuada (el 54% de los pacientes fueron sometidos a Gastrectomía sin linfadenectomía, es decir D0); así como el hecho de que el beneficio parece lograrse por una disminución de las recidivas locoregionales por cuanto las recaídas a distancia son idénticas entre los 2 grupos del estudio.

Más recientemente, en 2005, Kim y cols (Kim S 2005) presentaron los resultados de un estudio retrospectivo que incluía 544 pacientes tratados mediante linfadenectomía D2 seguida de quimioradioterapia con 5-Fu y Leucovorin en el periodo 1995 – 2001. Los resultados de este grupo se

comparaban con los de 446 pacientes tratados sólo con cirugía en el mismo periodo. La administración de tratamiento quimiorradioterápico adyuvante demostró lograr un aumento en la supervivencia global (mediana SG 95.3 meses vs 62.6 meses  $p=0.02$ ), así como en la supervivencia libre de enfermedad (75.6 meses vs 52.7 meses  $p=0.016$ ) en pacientes sometidos a una cirugía apropiada (gastrectomía con linfadenectomía D2).

## TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO DE LA ENFERMEDAD AVANZADA O METASTÁSICA

El tratamiento quimioterápico de los carcinomas gástricos metastásicos debe considerarse aun hoy en día como un tratamiento paliativo. A pesar de los diferentes esquemas terapéuticos empleados en los ensayos llevados a cabo en los últimos 30 años la supervivencia global de los pacientes sigue siendo pobre, por lo cual la búsqueda de un tratamiento eficaz sigue siendo una línea prioritaria de investigación en esta neoplasia. En la tabla 5 se muestra un resumen de los fármacos más empleados y su tasa de actividad antitumoral cuando han sido empleados en monoterapia para el tratamiento del cáncer gástrico avanzado.

**Tabla 5. Actividad de los citostáticos empleados en monoterapia en cáncer gástrico**

Agente	% Respuestas	Agente	% Respuestas
<b>5-Fu</b>	20	<b>Docetaxel</b>	15,9
<b>5-Fu/Leucovorin</b>	33,3	<b>Paclitaxel</b>	20
<b>Doxorrubicina</b>	17	<b>Capecitabina</b>	19.4
<b>Mitomicina C</b>	30	<b>UFT</b>	27
<b>Cisplatino</b>	25	<b>S-1</b>	49
<b>Irinotecan</b>	23,3	<b>Topotecan</b>	10

Durante la **década de 1970** numerosos ensayos clínicos trataron de mejorar la eficacia de la monoterapia mediante el empleo de esquemas que combinaban 2 (dobletes) o 3 (tripletes) agentes quimioterápicos simultáneamente. De estos estudios preliminares, se pudieron obtener varias conclusiones clínicamente significativas: el empleo de Nitrosureas (MeCCNU o BCNU) no mejoraba los resultados de la aplicación de 5-Fu en monoterapia; la tasa de respuestas de los esquemas de combinación era superior a la obtenida con los fármacos en monoterapia y el esquema FAM (5-Fu, Adriamicina y Mitomicina C) mostró mejores resultados que las combinaciones AM (Adriamicina, Mitomicina C), FAMe (5-Fu, Adriamicina, MeCCNU) o FMe (5-Fu, MeCCNU) siendo considerado en aquel momento el esquema standard de tratamiento (Levi JA 1986, Schnitzler G 1986, Douglass Ho 1984).

En los **años 80 del pasado siglo** se desarrollaron los que fueron denominados regímenes quimioterápicos de 2ª generación. Entre estos nuevos esquemas la combinación FAMTX (5-Fu, Adriamicina y Metrotexate a altas dosis) demostró su superioridad frente al estándar FAM. Este esquema logró demostrar en un ensayo randomizado que incluyó 213 pacientes, una mejora significativa en la tasa de respuestas (41% vs 9%) así como en la supervivencia global (mediana de 42 semanas vs 29 semanas del esquema FAM), sin aumentar la toxicidad ni la mortalidad del tratamiento (Wils JA 1991). Otros esquemas de 2ª generación que demostraron su eficacia fueron el esquema ELF (5-Fu, Leucovorin y Etopósido), PELF (Cisplatino, 5-Fu, Leucovorin y Etopósido), PF (Cisplatino, 5-Fu) y ECF (Epirrubicina, Cisplatino, 5-Fu) (Wilke H 1990, Findlay M 1994), siendo la mielosupresión severa uno de los principales efectos tóxicos comunes a todos estos esquemas.

**Esquemas Basados en Cisplatino.** De manera progresiva se han ido desarrollando esquemas de quimioterapia de 2ª línea basados en combinaciones de diversos citostáticos con cisplatino, siendo el primero de los aplicados la combinación de Etoposido, Doxorrubicina y Cisplatino (EAP). Este esquema se comparó en un ensayo randomizado frente a FAMTX (Kelsen D 1992) no siendo superior en términos de eficacia y sí más tóxico (mortalidad 13% vs 0% del FAMTX), por lo cual el estudio fue cerrado y este esquema desechado. Por el contrario la administración de Cisplatino en combinación con 5-Fu (PF) demostró una mayor actividad antitumoral (51% respuestas objetivas frente a 26%) así como un incremento significativo en la mediana de supervivencia libre de progresión tumoral cuando este doblete se comparó de manera aleatorizada con el esquema sin platino FAMTX (Kim NK 1993). De manera confirmatoria en la década de 1990 la Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento el Cáncer (EORTC) llevó a cabo un ensayo fase III comparando la combinación PF frente a ELF y frente al esquema considerado estándar en ese momento FAMTX (Vanhoefer U 2000). Los tres esquemas lograron una supervivencia similar (7.2 meses PF y ELF, 6.7 meses FAMTX) con toxicidades hematológicas y extrahematológicas aceptables. A pesar de ello la eficacia de estos esquemas fue considerada subóptima (Tasa de respuestas 9%ELF, 12% PF, 9% FAMTX); por lo cual se han seguido desarrollando esquemas basados en cisplatino que mejorasen estos resultados.

En 1997 se publicaron los resultados del esquema desarrollado en el Royal Marsden Hospital con la triple combinación de Epirrubicina, Cisplatino y 5-Fu (ECF). Este triplete se comparó frente a FAMTX en un ensayo randomizado

que incluyó 260 pacientes (Webb A 1997). La combinación ECF logró una mayor tasa de respuestas objetivas (45% frente a 21% p 0.0002), una mejor supervivencia global (8.9 meses vs 5.7 meses p 0.0009) así como una mayor supervivencia libre de progresión tumoral (7.4 meses vs 3.4 meses p0.00006). Un análisis posterior de los resultados obtenidos en este estudio confirmó el beneficio demostrado en términos de supervivencia y es por ello que ha sido considerado el esquema de tratamiento estándar en cáncer gástrico avanzado en muchos países europeos hasta la década actual (Waters JS 1999).

Este esquema ECF fue la rama de tratamiento estándar utilizada para el ensayo REAL 2 recientemente publicado (Cunningham D 2008). Este es un estudio fase III randomizado con un diseño factorial 2x2 en el cual se distribuyeron los pacientes entre 4 grupos de tratamiento: ECF, EOF (epirrubicina, Oxaliplatino, 5-Fu), EOX (Epirrubicina, Oxaliplatino, capecitabina) o ECX (Epirrubicina, cisplatino, Capecitabina). El estudio fue diseñado para demostrar la no inferioridad de Capecitabina frente a 5-Fu y de Oxaliplatino frente a Cisplatino cuando se utilizan para el tratamiento del cáncer gástrico avanzado en un esquema con 3 fármacos. Tras la inclusión de más de 1000 pacientes los resultados mostraron la no inferioridad de Capecitabina frente a 5-Fu y de Oxaliplatino frente a Cisplatino. No se demostraron diferencias significativas en la tasa de respuestas entre los 4 esquemas empleados (47.9% EOX, 46.4% EOF, 42.4% ECX y 40.7% ECF); aunque sí una diferencia estadísticamente significativa a favor de EOX comparado con ECF en términos de supervivencia global (mediana 11.2 meses EOX vs 9.9 meses ECF p 0.02). Este ensayo junto al publicado por Kang y cols (Kang YK 2009) demostró la

equivalencia de 5-Fu y Capecitabina cuando se administran en combinación con derivados del platino.

**Esquemas Basados en Taxanos.** La introducción de los nuevos taxanos en la década de los años 90 llevó a su estudio como fármacos activos en cáncer gástrico, especialmente tras demostrar el Paclitaxel unas tasas de respuesta entre el 22% y el 51% en diversos ensayos fase II ([Kollmannsberger C 2000](#), [Gadgeel SM 2003](#)). Del mismo modo los dobles o tripletes de fármacos conteniendo Docetaxel lograron tasas de respuesta del 33-55% con medianas de supervivencia de 9-10 meses ([Ajani JA 2005](#), [Thuss-Patience PC 2005](#)). Entre los taxanos sólo Docetaxel ha sido evaluado en el contexto de un ensayo clínico randomizado fase III. Este fue el ensayo V-325 ([Ajani JA 2007a](#)) recientemente publicado y en el cual 445 pacientes fueron randomizados a recibir Docetaxel, Cisplatino y 5-Fu (DCF) vs Cisplatino y 5-Fu (CF). La adición de Docetaxel al esquema standard CF logró una mejoría estadísticamente significativa en la supervivencia global de los pacientes (9.2 meses vs 8.6 meses  $p=0.02$ ), así como en el intervalo libre de progresión (5.6 meses vs 3.7 meses  $p < 0.001$ ) y en la tasa de respuestas objetivas (37% vs 25% con CF  $p = 0.01$ ). Asimismo, el esquema DCF mostró una mejoría en la calidad de vida de los pacientes a pesar de resultar un esquema notablemente más tóxico (toxicidades grado III-IV 69% de los pacientes, neutropenia febril 29%) ([Ajani JA 2007b](#)).

Este triplete (DCF) ha sido también comparado con el esquema de 3 fármacos ECF y con el doblete DC (Docetaxel, platino) en un ensayo multicéntrico randomizado ([Roth AD 2007](#)). Entre los 120 pacientes randomizados se logró una tasa de respuestas del 25% para ECF, 18.5% para DC y 36.6% para el



tripleto DCF. La mediana de supervivencia fue favorable a los esquemas conteniendo Docetaxel (8.3 meses ECF, 11.0 DC y 10.4 meses DCF) de manera estadísticamente significativa pero, al contrario de lo demostrado en el ensayo V-325, la calidad de vida fue superior en el esquema sin taxanos (ECF). Esto revela la importancia fundamental de la selección de los pacientes y del manejo de la toxicidad de los esquemas empleados a la hora de lograr diferencias en términos de beneficio clínico.

El más recientemente publicado Meta-análisis del tratamiento quimioterápico del cáncer gástrico avanzado ha sido llevado a cabo por Wagner y cols (Wagner AD 2006). Aunque su análisis no es completo por cuanto no incluye los estudios con esquemas que incluyen taxanos las conclusiones principales de éste meta-análisis se resumen en:

- Los esquemas de combinación de fármacos son superiores en términos de supervivencia a los tratamiento en monoterapia (HR 0.83 IC95% 0.74-0.93)
- Los esquemas de 3 fármacos incluyendo antraciclinas, 5-Fu y cisplatino consiguen un incremento estadísticamente significativo en la supervivencia de los pacientes (HR 0.77 IC95% 0.62 – 0.91) frente a los esquemas de Cisplatino y 5-Fu sin antraciclinas. Este beneficio es similar si se comparan esquemas con 5-Fu, antraciclinas y Cisplatino frente a los esquemas sin Cisplatino (HR 0.83 IC95% 0.79 – 0.91).
- El incremento de mortalidad en los esquemas de 3 fármacos que incluyen 5-Fu parece relacionado con la administración de este fármaco

en bolo intravenoso, siendo menos tóxica su administración en infusión continua como se contempla en el esquema ECF.

- Los esquemas basados en Irinotecan no han demostrado un beneficio significativo frente a los esquemas sin este fármaco, no habiendo sido además nunca comparados frente a tripletes como ECF.

En el momento actual se deben considerar los esquemas de 3 fármacos (tripletes) como tratamiento estándar de 1ª línea en los pacientes con cáncer gástrico avanzado. La base de estos esquemas debe ser la combinación de cisplatino y 5-Fu, pudiendo sustituirse el cisplatino por Oxaliplatino y el 5-Fu en infusión continua por Capecitabina. La elección de taxanos o antraciclinas como tercer componente del esquema debe basarse en una cuidadosa selección del paciente y un adecuado tratamiento de soporte ante la mayor toxicidad severa de los esquemas que incluyen docetaxel.

Cuando los pacientes recidivan o la enfermedad progresa tras un tratamiento quimioterápico de 1ª línea el pronóstico de los pacientes es ominoso. La mayoría de los fármacos testados en 2ª línea han logrado resultados discretos con tasas de respuesta en torno al 10% y medianas de tiempo hasta progresión entre 2 y 5 meses y supervivencia global entre los 5 y 8 meses. Los esquemas con resultados más prometedores son los basados en taxanos y/o Irinotecan, no pudiéndose considerar en el momento actual ningún esquema como estándar de tratamiento (Polyzos A 2006, Koderá Y 2007, Guiliiani F 2005, Wilson D 2005).

## MOLÉCULAS NUEVAS DIRIGIDAS FRENTE A DIANAS

### MOLECULARES EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER GÁSTRICO

La mejoría escasa de los resultados terapéuticos obtenida con la incorporación de esquemas de poliquimioterapia en el manejo de los tumores gástricos avanzados, unida a la notable toxicidad de estos tratamientos, ha llevado al estudio y desarrollo de nuevos fármacos dirigidos contra dianas moleculares implicadas en la modulación de mecanismos de transducción de señales intracelulares. Entre los numerosos fármacos desarrollados en ensayos clínicos se encuentran inhibidores de la angiogénesis, agentes frente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), inhibidores del ciclo celular, de las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs) o del proteosoma; tal y como se resume en la tabla 6.

Tabla 6. Nuevas moléculas dirigidas frente a dianas específicas en cáncer gástrico

Diana	Agente	Descripción	Fase
Angiogenesis	<b>Bevacizumab</b>	Anticuerpo monoclonal humanizado anti-VEGF	III
	<b>Sunitinib</b>	Molécula frente a VEGFRs, PDGFR- $\beta$ , and c-Kit	I-II
	<b>Sorafenib</b>	Molécula frente a RAF, VEGFRs, PDGFR- $\beta$	I-II
EGFR/HER-2	<b>Cetuximab</b>	Ac Monoclonal quimérico anti-EGFR	III
	<b>Matuzumab</b>	Ac monoclonal humanizado anti-EGFR	I
	<b>Panitumumab</b>	Ac Monoclonal humano anti-EGFR	II
	<b>Gefitinib</b>	Inhibidor de Tyrosine kinasa asociada a EGFR	II
	<b>Erlotinib</b>	Inhibidor de Tyrosine kinasa asociada a EGFR	II
	<b>Trastuzumab</b>	Ac Monoclonal anti-HER-2	III
	<b>Lapatinib</b>	Molécula pequeña inhibidora de EGFR y HER-2	III
<b>Ciclo celular</b>	<b>Flavopiridol</b>	Paninhibidor de CDKs	I-II
<b>MMP</b>	<b>Marimastat</b>	Inhibidor de MMPs	III
<b>Proteosoma</b>	<b>Bortezomib</b>	Molécula inhibidora del proteosoma	II

**INHIBIDORES DE LA ANGIOGÉNESIS.** La formación de neovasos o angiogénesis tumoral tiene un papel central en el proceso de crecimiento tumoral y en la aparición de metástasis a distancia. El Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF-A) es un regulador crítico de los mecanismos de angiogénesis que está habitualmente sobreexpresado en neoplasias humanas incluido el cáncer gástrico. Su expresión se ha correlacionado con un estadio tumoral más avanzado y un riesgo mayor de progresión en pacientes con cáncer gástrico (Feng CW 2002, Maeda K 1996). Entre los fármacos

desarrollados específicamente frente al VEGF destacan los anticuerpos monoclonales anti-VEGF (Anti-VEGF MoAbs) y las pequeñas moléculas inhibidoras de la actividad tirosina kinasa del receptor del VEGF (VEGFR-TKIs). Entre los primeros el Bevacizumab es el más estudiado en esquemas de poliquimioterapia. Dos estudios fase II (Shah MA 2006, Kelsen D 2009) evaluaron la combinación de este Anticuerpo con Irinotecan y Cisplatino o un triplete de Docetaxel, Cisplatino y 5-Fu a dosis reducidas. A pesar de ser ensayos de tamaño muestral limitado (47 y 36 pacientes incluidos respectivamente) la tasa de respuestas objetivas logradas fue del 65% en ambos estudios, reflejando un beneficio potencial de la adición de este nuevo agente biológico a los esquemas clásicos de quimioterapia antineoplásica. El principal inconveniente de estos estudios fue la alta tasa de complicaciones vasculares que presentaron los pacientes (25% trombosis venosas profundas o tromboembolismos pulmonares, 4% hemorragias). Otros esquemas estudiados en ensayos preliminares incluyen la combinación de Bevacizumab con Docetaxel semanal o de Bevacizumab con Capecitabina y Mitomicina C (Enzinger PC 2006, Peinert S 2006). El verdadero papel de este AntiVEGF en el tratamiento del cáncer gástrico lo determinarán los ensayos fase III randomizados en marcha que estudian su utilidad en cáncer gástrico metastásico (AVAGAST) y en el tratamiento neoadyuvante del cáncer potencialmente resecable (MAGIC-B).

Una estrategia diferente es el empleo de pequeñas moléculas dirigidas frente a la porción intracelular y metabólicamente activa del Receptor de Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGFR). Esta porción intracelular posee una actividad enzimática de carácter tirosina Kinasa que se activa tras la unión del

ligando (VEGF) al receptor y es la responsable de la transducción de la señal a los siguientes efectores de la vía de activación relacionada con este receptor. Entre las pequeñas moléculas estudiadas se encuentran el Sorafenib, el Sunitinib y el Vandetanib. Todos ellos se hallan en las fases preliminares, fases I-II, de su desarrollo en combinación con quimioterapia habiendo demostrado únicamente Sunitinib cierta eficacia clínica en un ensayo como agente único en cáncer gástrico avanzado (Bang Y 2007).

**INHIBIDORES DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGFR).** La vía de señales relacionada con el EGFR está presente y activada en numerosas neoplasias epiteliales y entre ellas el cáncer gástrico. Su activación conlleva un incremento en la proliferación celular, en la capacidad de invasión y metástasis de la célula así como una mayor angiogénesis mediada por un incremento en la producción de VEGF tumoral. Frente al EGFR se están desarrollando esquemas de tratamiento que emplean tanto Anticuerpos monoclonales frente a la porción extracelular del receptor como moléculas que se unen de manera competitiva a la parte intracelular y metabólicamente activa del receptor, impidiendo de este modo la transmisión de la activación a los efectores situados por debajo en la vía de señalización de EGFR.

Entre los anticuerpos monoclonales en desarrollo se encuentran Cetuximab, Panitumumab y Matuzumab. El Cetuximab es un anticuerpo monoclonal quimérico (humano-murino) de tipo Ig G1 (Grünwald V 2003) cuya actividad se ha testado en tres ensayos fase II en combinación con FOLFIRI (Irinotecan y 5-Fu) (Pinto C 2007), FUFOX (Oxaliplatino y 5-Fu) (Lordick F 2007) o TC (Docetaxel, cisplatino) (Pinto C 2008). En estos estudios la tasa de respuestas

se encuentra entre el 45% y el 65%, con medianas de supervivencia de 12 meses; ligeramente superiores a lo conseguido únicamente con quimioterapia. De manera interesante el estudio de biomarcadores en uno de estos ensayos demostró cómo la actividad de este anticuerpo frente al tumor no se relaciona con la existencia de mutaciones en K-Ras ni con la amplificación o no del gen del EGFR. Por el contrario la tasa de respuesta fue del 100% en aquellos casos que mostraban sobreexpresión del receptor determinada por inmunohistoquímica junto con niveles bajos de los ligandos EGF y TGF $\alpha$  del mismo (Han SW 2009).

De manera concomitante se están llevando a cabo ensayos clínicos precoces Fase I-II con Panitumumab (Lordick F 2008), anticuerpo monoclonal humano tipo IgG2 frente a EGFR, y con Matuzumab (Trarbach T 2005), anticuerpo humanizado frente al mismo receptor. Ambos fármacos se estudian en combinación con esquemas de quimioterapia con una conocida actividad en cáncer gástrico (EOX, ECX). Los resultados de estos estudios y del ensayo Fase III EXPAND, que estudia de manera prospectiva y randomizada el posible beneficio de añadir Cetuximab a una combinación de cisplatino y capecitabina, determinarán de manera más clara el papel de las terapias dirigidas frente al EGFR en esta neoplasia.

Las moléculas pequeñas dirigidas frente a la porción intracelular del EGFR no han demostrado poseer actividad significativa en cáncer gástrico cuando se han estudiado en monoterapia. Los resultados tanto con Erlotinib como con Gefitinib han sido decepcionantes (Dragovich T 2006, Ferry DR 2007), no evidenciándose respuestas objetivas entre los pacientes incluidos en los estudios. La explicación a esta falta de actividad es motivo de investigación en

el momento actual. El estudio farmacocinético realizado en el ensayo con Gefitinib mostró que el fármaco alcanzaba el tumor a concentraciones suficientes para inhibir EGFR pero la subsiguiente fosforilación de MAPK y Akt (pasos inmediatamente siguientes en la cascada de actividad desencadenada por la activación de EGFR) no era significativamente inhibida por el fármaco (Rojo F 2006).

**INHIBIDORES DEL CICLO CELULAR.** Las ciclinas dependientes de Kinasas (CDKs) son necesarias para la progresión de la célula a través de las distintas fases del ciclo celular. El Flavopiridol es un inhibidor de CDKs que produce una detención del ciclo celular en las interfases G1–S y G2–M. En un ensayo Fase I con este fármaco (Thomas JP 2002) se determinó la máxima dosis tolerable (40 mgrs/m<sup>2</sup>/24 hs) y se observó una remisión completa en un paciente con cáncer gástrico avanzado. Esta actividad no se confirmó en un fase II con Flavopiridol como agente único, resultando ser un fármaco notablemente más tóxico de lo esperado (Schwartz GK 2001). Posteriormente se han llevado a cabo estudios fase I en combinación con Irinotecan y cisplatino o taxanos con desigual resultado.

**INHIBIDORES DE LAS METALOPROTEINASAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR (MMPs).** Las MMPs son proteasas zinc dependientes que degradan las proteínas del tejido conectivo y están implicadas en fenómenos de proliferación celular tumoral, diferenciación, angiogénesis y apoptosis (Nomura H 1995). MMP-2 está sobreexpresada en cáncer gástrico y se ha relacionado con un mayor riesgo de progresión tumoral y de metástasis ganglionares (Möning SP 2001). Marimastat es un fármaco oral con actividad como inhibidor de MMPs. Un único ensayo realizado en cáncer gástrico



avanzado no logró demostrar actividad antitumoral significativa cuando se administró como monoterapia. Un estudio randomizado posterior en el cual se administraba como terapia de mantenimiento tras quimioterapia sí demostró cierto beneficio con respecto al intervalo libre de progresión de enfermedad pero sin impacto en la supervivencia global de los pacientes (Bramhall SR 2002). Estos resultados tan pobres han llevado a su abandono como posible agente frente al cáncer gástrico.

**INHIBIDORES DEL PROTEOSOMA.** En la patogénesis de diversas neoplasias entre las cuales se encuentra el cáncer gástrico se ha implicado la activación constitutiva del factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B. Este puede ser inhibido a través de una proteína inhibidora específica (I $\kappa$ B) (Patel NM 2000). La activación de NF- $\kappa$ B puede prevenirse mediante la inhibición de la degradación de I $\kappa$ B mediada por el proteosoma. Este mecanismo se ha mostrado eficaz para aumentar la sensibilidad al tratamiento quimioterápico en líneas celulares y modelos animales. Bortezomib es un inhibidor del proteosoma que ha demostrado cierta actividad antitumoral en diversos tumores entre los cuales están el mieloma múltiple y el cáncer gástrico. En un ensayo piloto (Ocean AJ 2007) en pacientes con adenocarcinomas gástricos se administró Bortezomib en monoterapia en pacientes tratados previamente con quimioterapia o en combinación con Irinotecan en paciente sin tratamiento previo. La tasa de respuesta objetivas fue del 9% (monoterapia) y del 44% (Bortezomib + Irinotecan). A pesar de estos resultados la supervivencia global y libre de progresión de los pacientes fue pobre (1.4 meses, 5.4 meses) y la toxicidad severa, siendo un fármaco en estudio en el momento actual

únicamente en combinación con 5-Fu y leucovorin dentro de un ensayo fase II en pacientes con cáncer gástrico avanzado.

De todo lo expuesto anteriormente se evidencia una necesidad imperiosa de estudios que desarrollen nuevos abordajes terapéuticos en cáncer gástrico avanzado. Los resultados obtenidos con quimioterapia citotóxica parecen haber alcanzado una meseta y es preciso un conocimiento más profundo de los eventos moleculares que caracterizan y condicionan la aparición y progresión del cáncer gástrico. Entre estos estudios de oncología traslacional, el papel del oncogén HER2 y de los fármacos dirigidos contra el mismo han resultado especialmente prometedores como se refleja posteriormente en esta tesis, siendo ésta misma parte de esos estudios iniciales.

## EL ONCOGÉN *HER 2/NEU*

### ORIGEN Y GENERALIDADES

El Oncogén *HER2/neu*, también denominado *c-erb-B2*, *ErbB2* o *HER2*, fue identificado por primera vez como un oncogén activado por una mutación puntual en neuroblastomas químicamente inducidos en roedores, motivo por el cual se denominó con el sufijo neu (Schechter AL, 1984); identificándose posteriormente su sobreexpresión en carcinomas de mama humanos (King Cr 1985). En los seres humanos el receptor *HER2* está presente en tejidos normales pero sólo se sobreexpresa o se encuentra amplificado en tejido neoplásico, incluyendo un 25-30% de los cánceres de mama en los cuales se asocia a un peor pronóstico y un comportamiento clínico más agresivo (Park JW, 2000). La amplificación de este gen tiene un papel directo en la tumorigénesis mamaria (Hudziac RM, 1987) y ha permitido diseñar terapias dirigidas específicamente frente a él tanto en cáncer de mama como en cáncer gástrico (Albanell J, 1999).

### ESTRUCTURA Y FUNCION

El oncogén *HER2/neu* es uno de los cuatro componentes de la familia de receptores transmembrana tipo 1 con actividad tirosina kinasa (Familia ErbB). En ella se incluyen junto a *HER2/neu* (erb-B2): EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) o HER1 (erb-B1), HER3 (erb-B3) y Her-4 (erb-B4). El proto-oncogén *HER2/neu* está localizado en el cromosoma 17 (Cr17) y codifica una proteína transmembrana de 185-kDa. Todos los componentes de la familia ErbB presentan una elevada homología entre sí y se componen de tres dominios funcionales: un dominio extracelular en el cual se produce la unión del

ligando, un segmento dominio transmembrana con conformación de hélice  $\alpha$  y un dominio intracelular con actividad enzimática tirosina kinasa. A pesar de poseer los mismos dominios esenciales, la actividad funcional de cada receptor es diferente. EGFR (HER1) y HER4 tienen actividad enzimática tirosina kinasa y varios ligandos conocidos con capacidad de unirse a su dominio extracelular (Betacelulina o BTC, Heregulina, TGF $\alpha$ , EGF, Heparin-Binding growth factor o HB-EGF, Amphirregulina o Neuregulina); por el contrario HER3 puede unirse a varios de estos ligandos pero no tiene actividad tirosina kinasa intrínseca debido a la sustitución en su estructura de aminoácidos críticos para dicha función (Guy PM, 1994) y para HER2 no se han identificado ligandos directos pero sí actividad tirosina kinasa en su porción intracelular (Hynes NE 2005; Yarden Y 2001; Olayioye MA 2000; Burgess AW 2003).

De manera genérica la unión del ligando provoca un cambio conformacional en el receptor que facilita la formación de homodímeros o heterodímeros entre los diversos receptores. Estos dímeros son capaces de desencadenar una serie de fosforilaciones en residuos tirosina de moléculas relacionadas con diversas vías de señalización intracelular interviniendo de este modo en procesos fundamentales de la célula como son la proliferación celular, la regulación de la apoptosis, la angiogénesis y la progresión del ciclo celular.

## MECANISMOS DE ACTIVACIÓN

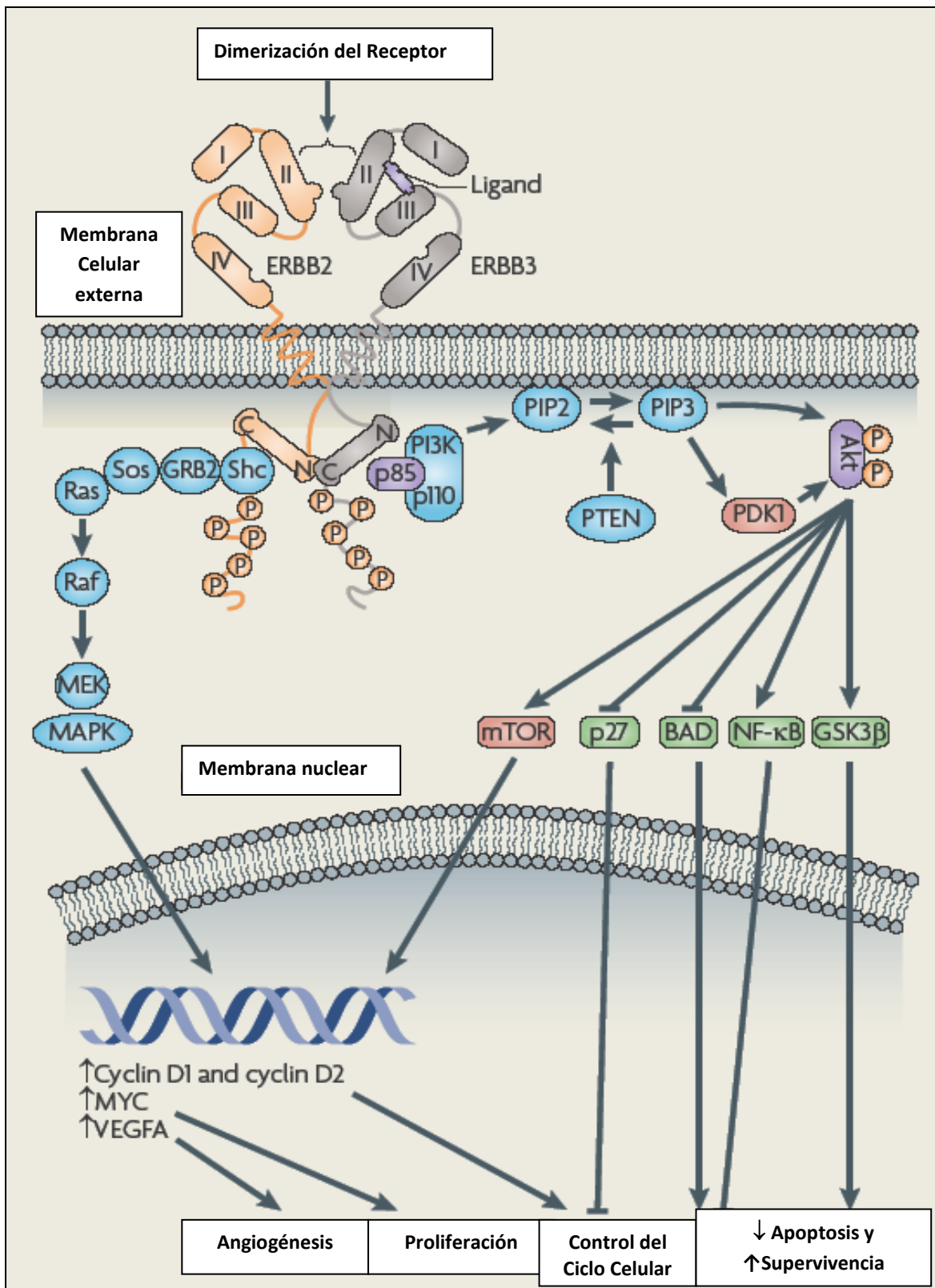
La activación de *HER2* se lleva a cabo fundamentalmente a través de la formación de homodímeros (2 receptores *HER2*) o heterodímeros (*HER2/HER3*, *HER2/HER1*, *HER2/HER4*) tras la unión del ligando a su receptor específico. En el caso de los homodímeros de *HER2* su formación no es inducida por la unión de ningún ligando sino que se han descrito algunos mecanismos alternativos de activación de este oncogén. Además de la amplificación génica se ha descrito el gen *FOXP3*, un gen supresor ligado al cromosoma X, que mantiene niveles bajos de ErbB2 y su ausencia o mutación provoca una elevación de estos niveles (Zuo T, 2007). Independientemente de cuál sea el mecanismo causal la sobreexpresión de moléculas de HER 2 en la superficie de la célula tumoral facilita la formación de heterodímeros y de homodímeros de *HER2* de manera espontánea, lo que lleva a la activación de las vías de señalización intracelular que describimos a continuación. Asimismo, *HER2* puede estar activado de manera aberrante por mutaciones espontáneas en su secuencia (Cappuzzo F, 2006; Wang SE 2006).

La formación de dímeros produce la fosforilación cruzada de cada uno de los 2 componentes del mismo, creando un cambio conformacional que facilita el reclutamiento y la unión de los subsiguientes efectores de las vías a activar y la transmisión de la señal intracelular (Figura 4).

Existen dos vías clave de señalización que son activadas por los dímeros HER: la vía de las MAPKinasas y la vía del PI3K-Akt. La activación de la vía MAPK lleva a un incremento en la transcripción de genes que controlan la proliferación

y la migración celular, la diferenciación celular y la angiogénesis a través de un incremento en los niveles de expresión de, entre otros, Ciclinas D1 y D2, Myc y VEGF-A (Vascular Endotelial Growth Factor-A) (Yarden Y 2001, Olayioye MA 2000 ). La activación a través de la vía de PI3K-Akt conduce a un incremento en la supervivencia celular y aun incremento de las señales antiapoptóticas. De las 3 clases conocidas de PI3K, las principales implicadas en la mediación de las señales de activación generadas por la activación de HER es la clase 1ª (Fruman DA 1998). Esta clase está compuesta por 2 subunidades: una reguladora (p85) que resulta crucial para su función y una catalítica (p110). La activación de PI3K se produce mediante su unión y fosforilación directa por los residuos tirosinakinasa de los dímeros o bien a través de moléculas adaptadoras unidas a los dímeros como es el complejo GRB2-Sos-Ras que interactúa con la subunidad p85. La activación por fosforilación de PI3K lleva a la activación de Akt, familia de moléculas con actividad serina-treonina kinasa que mediante sucesivas fosforilaciones en cascada de muchas otras proteínas inician un proceso que regula la supervivencia celular, el ciclo celular y la supresión de la apoptosis a través de la activación o supresión de, entre otros, mTOR, p27, BAD, NK- $\kappa$ B, GSK3 $\beta$  (Cantley LC 2002, Engelman JA 2006, Vivanco I 2002, Yuan TL 2008).

Figura 4. Mecanismos de activación de HER2. Modificado de Baselga J 2009.



## TERAPIAS DIRIGIDAS FRENTE A *HER2*

El potencial teórico de *HER2* como una diana para el tratamiento antitumoral fue comprobado en experimentos que, de manera precoz, mostraron como los anticuerpos monoclonales dirigidos frente al dominio extracelular del receptor lograban una inhibición del crecimiento de las células de cáncer de mama que sobreexpresaban *HER2* (Hudziak RM 1989, Baselga J 1998). Posteriormente, el empleo de modelos tumorales con ratones modificados genéticamente para hacer sus tumores de mama altamente dependiente de las señales activadas a través de *HER2*, demostró como la inactivación de este oncogén lograba la regresión tumoral hasta límites clínicamente indetectables (Moody SE 2002, Ursini-Siegel J 2007). Este reconocimiento del papel de *HER2* como un oncogén que regula la evolución del tumor ha llevado al desarrollo de una amplia variedad de agentes antitumorales cuyo mecanismo de acción se basa en interferir la función de *HER2* y detener la señalización intracelular en cascada que sigue a la activación del receptor. Los agentes en desarrollo más avanzado frente al oncogén *HER2* en el momento actual se resumen en el siguiente cuadro.



Tabla 7. Agentes dirigidos frente al HER2.

Agente	Diana	Mecanismo	Fase Desarrollo	Indicación Aprobada
<b>ACs Monoclonales</b>				
<b>Trastuzumab (Herceptin®)</b>	ERBB2	Suprime la señalización de ErbB2, estabiliza ERbB2, marca las células para su ataque por el sistema inmune.	Aprobado Ca Mama Aprobado Ca Gástrico	Ca Mama  Ca Gástrico
<b>Pertuzumab</b>	ERBB2	Inhibidor de la dimerización, marca las células para su ataque por el sistema inmune.	Fase III Ca Mama. Fase II Ca Ovario.	Ninguna
<b>Trastuzumab-DM1</b>	ERBB2	Administración de un agente antimicrotúbulo dirigida frente a las células <i>HER2</i> positivas	Fase III Ca Mama	Ninguna
<b>Ertumaxomab</b>	ERBB2	Afinidad biespecífica que permite el reclutamiento de células T	Fase III Ca Mama	Ninguna
<b>Inhibidores de Tirosin-Kinasa (TKI)</b>				
<b>Lapatinib (Tykerb®)</b>	ERBB2	TKI	Fase III Ca Gástrico Fase II Ca Pulmón, CCC Fase II Ca Colorectal Aprobado Ca Mama	Ca Mama.
<b>HKI-272</b>	EGFR, ERBB2	TKI Irreversible	Fase II Ca Mama	Ninguna
<b>ARRY-334543</b>	EGFR, ERBB2, ERBB4	TKI Irreversible	Fase II Ca Mama	Ninguna
<b>BIBW-2992</b>	EGFR, EBB2	TKI Irreversible	Fase II Ca Mama Fase III Ca Pulmón Fase II CCC	Ninguna
<b>Inhibidores de Heat-Shock Protein</b>				
<b>17-AAG</b>	HSP90	Reduce la estabilidad de ERBB2, detiene la señalización mediada por ERBB2	Fase III MM Fase II Ca Mama	Ninguna
<b>IPI-504</b>	HSP90	Reduce la estabilidad de ERBB2, detiene la señalización mediada por ERBB2	Fase II y III MM Fase II Ca Mama, Ca Pulmón, Melanoma y Ca Ovario.	Ninguna

HSP90: Heat-Shock Protein 90, EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor. CCC:Cáncer de cabeza y cuello. MM: Mieloma múltiple

De todos los agentes referidos anteriormente Trastuzumab (Herceptin®, Hoffman LaRoche, Basilea, Suiza) es el fármaco mejor conocido y con un desarrollo clínico más amplio hasta la fecha. Trastuzumab es un Anticuerpo monoclonal recombinante humanizado de la clase IG1 dirigido frente a la porción extracelular del *HER2*, obtenido por la sustitución de todos los componentes murinos del anticuerpo Mab4D5 (anticuerpo monoclonal murino frente al *HER2*), excepto la región de unión del antígeno (Eisenhauer EA 2001). Dado que es el primer anticuerpo monoclonal desarrollado frente al *HER2* sus mecanismos de acción son los mejor conocidos y se resumen en:

- Inducir la citotoxicidad mediada por Anticuerpos (ADCC) al “marcar” la célula tumoral *HER2* positiva para su ataque posterior por las células Natural Killer (NK) (Clynes RA 2000, Gennari R 2004, Musolino A 2008)
- Impidir la formación de la forma truncada p85<sup>HER2</sup> al interferir la acción de las metaloproteínas de la Matriz Extracelular sobre la porción extracelular del receptor.(Christianson TA 1998, Molina MA 2001)
- Impedir la dimerización de *HER2* y con ello la posterior activación de toda la cascada de señales intracelulares que conlleva (Delord JP 2005, Longva KE 2005, Cuello M 2001).
- Inhibir la activación de las rutas dependientes de *HER2* impidiendo la transcripción de genes implicados en mecanismos de angiogénesis tumoral, como por ejemplo la transcripción y posterior aumento de niveles de Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF) (Izumi Y 2002).
- Disminuir la expresión en la superficie celular de *HER2* al inducir la endocitosis del mismo y su posterior degradación, aunque este mecanismo es hoy en día discutido (Baselga 2001, Austin CD 2004).

De la misma manera son también más conocidos los posibles mecanismos de resistencia a este agente y sirven como base para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas frente al *HER2*. Entre los mecanismos de resistencia descritos se encuentran:

- Incremento de la señalización intracelular en la ruta activada por *HER2* debido a pérdida de PTEN o aumento en la actividad de AKT (Nagata Y 2004).
- Activación alternativa de la señalización intracelular por otros miembros de la familia HER (EGFR) o por sobreexpresión de sus ligandos (TGF- $\beta$ , Neuregulina) (Yarden Y 2001, Valabrega G 2005, Diemeier S 2005).
- Activación de la señalización intracelular por otras rutas mediante sobrecruzamiento de las mismas y por sobreexpresión de otros receptores como VEGFR (Receptor del VEGF) o IGFR1 (Insulin-like Growth Factor Receptor 1). (Lu Y 2001, Nahta R 2005)

## HER2 Y NEOPLASIA DE MAMA

La amplificación del gen *HER2* y/o su sobreexpresión proteica ha sido demostrada en un 10-34% de los casos de cáncer de mama invasivo (Slamon 1989, Ross JS 2004.). Al contrario de lo que ocurre en otras neoplasias, en el cáncer de mama la amplificación génica de *HER2* se asocia de manera uniforme con la sobreexpresión proteica del mismo (*HER2* p185neu) y la incidencia de sobreexpresión sin amplificación es extremadamente rara (Kallioniemi OP 1992, Sauter G 2009). La amplificación del oncogén *HER2* se asocia con un incremento de la proliferación celular, una motilidad celular mayor, una mayor capacidad invasiva, un aumento en la incidencia de

metástasis ganglionares locoregionales y metástasis a distancia, una reducción en la apoptosis y un aumento en los mecanismos de angiogénesis tumoral (Moasser MM 2007). Cuando se comparan de acuerdo a parámetros clásicos clínico-patológicos, los casos de cáncer de mama *HER2* positivos tienden a ser con mayor frecuencia moderada o pobremente diferenciados, con una positividad menor para los receptores de estrógenos y progesterona y un número mayor de metástasis ganglionares axilares al diagnóstico. En la reciente clasificación molecular del cáncer de mama (Perou CM 2000) los tumores *HER2* positivos se encuadran tanto en la categoría “*HER2*” como en la de tumores “luminales”. La positividad para *HER2* no sólo confiere un peor pronóstico a la neoplasia (Slamon 1987) sino que conlleva otra serie de características relacionadas como son:

- Los niveles de *HER2* se correlacionan con la carcinogénesis como se ha demostrado mediante experimentos de ganancia y pérdida de función de este gen (Faltus T 2004, Hudziak RM 1987, Choudhury A 2004).
- El nivel de sobreexpresión de *HER2* en la membrana de las células tumorales es mucho mayor que en los tejidos normales del adulto, lo que permite el desarrollo de terapias dirigidas frente a este receptor potencialmente menos tóxicas
- La sobreexpresión de *HER2* se encuentra tanto en el tumor primario como en las metástasis a distancia. Aunque estudios recientes muestran una posible pérdida de amplificación de este oncogén en algunos casos tras recibir tratamiento dirigido frente al mismo (Mittendorf EA, 2009).

Estas características llevaron al desarrollo precoz de Trastuzumab como terapia dirigida frente al *HER2/neu* en aquellos pacientes con cáncer de mama

que presentaban sobreexpresión o amplificación del mismo. Los ensayos fase II y III en pacientes con enfermedad metastásica demostraron la actividad antitumoral del mismo, con tasa de respuestas objetivas entre el 15% y el 30% cuando se emplea en monoterapia (Baselga J 1999) y del 50% al 80% cuando se utilizan esquemas en combinación con Taxanos o Vinorelbina (Montemurro F 2004). El beneficio del tratamiento frente al *HER2* no se limita a un incremento en el porcentaje de pacientes que responden al mismo sino que un ensayo fase III y un ensayo fase II randomizados demostraron un aumento clínico y estadísticamente significativo en la supervivencia de las pacientes que recibieron Trastuzumab asociado a quimioterapia frente al grupo que recibía quimioterapia sola (Slamon DJ 2001, Marty M 2005). Este éxito del tratamiento de la enfermedad avanzada llevó a su posterior estudio en situación de adyuvancia, es decir, en pacientes intervenidas de una neoplasia de mama *HER2/neu* positiva y sin evidencia clínica ni radiológica de enfermedad residual tras la intervención. En este contexto se han publicado los resultados de cinco ensayos randomizados que concluyen que el tratamiento con Trastuzumab en adyuvancia reduce el riesgo de recidiva tumoral de manera significativa (aprox un 50%) y disminuye la mortalidad en un 30%, a pesar de diferencias en el diseño de estos estudios y en el corto periodo de seguimiento de las pacientes (1 a 2 años) (Slamon 2005, Joensuu H 2006, Romond EH 2005, Piccart-Gebhart MJ 2005). En el momento actual Trastuzumab está indicado y autorizado por las agencias reguladoras europea (EMA) y americana (FDA) tanto en el tratamiento adyuvante como en el de la enfermedad avanzada de aquellas pacientes cuya neoplasia mamaria muestra sobreexpresión o amplificación de *HER2*. Asimismo se estudia su indicación como terapia

neoadyuvante, dada la alta tasa de respuestas objetivas que se consiguen en los esquemas de poliquimioterapia que incluyen este fármaco dirigido frente al receptor *HER2*.

## HER 2 Y OTROS TUMORES SÓLIDOS NO GÁSTRICOS

A diferencia de las neoplasias malignas de mama en las cuales el porcentaje de casos con sobreexpresión o amplificación de *HER2* está relativamente bien establecido, la positividad para *HER2* en otros tumores ha sido descrita frecuentemente pero con una notable disparidad de resultados (Sauter GI 2003, Zhang D 2003). Esta variabilidad se debe en parte al empleo de técnicas de inmunohistoquímica donde el uso de diferentes reactivos y la subjetividad de la lectura de resultados han provocado una gran variación en el tanto por ciento de casos positivos según las series. Como ejemplo la sobreexpresión de *HER2* en Cáncer No Microcítico de Pulmón varía desde 5,7% hasta 88,8% según diferentes estudios (Ugocsai K 2005, Bakir K 2002) y en el caso del Cáncer Colorectal el rango de positivos oscila entre 3,0% y 54% (Ooi A 2004, Porebska I 2000). Esta variabilidad de resultados es menor, aunque no inexistente, en aquellos estudios que emplean técnicas de hibridación *in situ* para el estudio del estado *HER2* del tumor. A pesar de una reducción en la subjetividad de la fase post-analítica del test en comparación con la IHQ, se han comunicado resultados positivos en cáncer de ovario que varían entre un 0 y un 66%, así como entre un 6% y un 56% en cáncer de mama (Schraml P 1999, Ross JS 1997, Ma Y 2005, Owens MA 2004).

Un trabajo reciente del Instituto de Patología en la Universidad de Basilea (Tapia 2007) ha estudiado de manera homogénea la sobreexpresión y

amplificación de *HER2* en micromatrices de tejido correspondientes a 2197 muestras de cáncer de mama y de 1 a 50 muestras de otros 125 tipos y subtipos tumorales diferentes (en total 5751 muestras), incluyendo cáncer de pulmón. En todos los casos emplearon el Herceptest® (Dako, Glostrup, Dinamarca) de acuerdo a las normas e instrucciones del fabricante para la detección por inmunohistoquímica de la sobreexpresión de *HER2* y un kit comercial Pathvysion,(Abbott Laboratories Abbott Park IL, USA) para la detección de la amplificación del gen por hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Para todos los tipos tumorales se emplearon como criterios de positividad un ratio *HER2*/centrómero 17 (CEP17)  $\geq 2$  por FISH y la escala de positividad de 0 a 3+ recomendada para la lectura de Herceptest. Los resultados de IHQ fueron valorables en 4467 de 5751 muestras (77,7%) siendo los tumores con un número mayor de casos 2+/3+ los de mama (13,2%), endometrio (6,8%), estómago (4,9%) y carcinomas uroteliales invasivos (6,7%). Fue posible analizar la existencia o no de amplificación génica del *HER2* en 3984 de 5751 muestras (69,3%). En éstas la mayor frecuencia de casos amplificados correspondió a las neoplasias de mama (16,9%) seguidas del carcinoma vesical invasivo (14,3%), cáncer gástrico (8,3%), esofágico (6,7%), pancreático (6,9%) y endometrial (6,6%). Es importante destacar la concordancia elevada de resultados entre ambas técnicas, especialmente en los casos de tumores no mamarios. Los resultados de IHQ y FISH fueron evaluables en la misma muestra en 3211 casos sobre un total de 5751 (55,8%). Todos los casos de tumores no mamarios con IHQ 3+ presentaron amplificación por FISH (100%) mientras que en los casos de tumores de mama esta coincidencia fue sólo del

91.4%. Asimismo la presencia de amplificación en casos de IHQ 0 fue del 1.6% en los casos de cáncer de mama y del 4.7% en los tumores de otra estirpe.

En los tumores del tracto gastrointestinal de origen extra gástrico, el número de estudios sobre la prevalencia del oncogén *HER2* y su posible uso como marcador pronóstico es notablemente inferior al de los publicados en cáncer de mama. En una revisión extensa de este tema publicada en 2001 ( [Ross JS 2001](#)) el número de estudios (46) y de pacientes incluidos en los mismos (4073) representaba menos del 25% de los correspondientes a cáncer de mama hasta esa fecha (más de 100 estudios y más de 16000 pacientes) ([Ross JS 1999](#)). A pesar de trabajos más recientes con metodología estandarizada y reproducible, los resultados siguen siendo contradictorios tanto en el número esperable de casos positivos como en la posible correlación de esta positividad con el pronóstico de la enfermedad ([Park DI 2007](#), [Sato-Kuwabara 2009](#), [Kavanagh DO 2009](#)).



## HER2 Y CÁNCER GÁSTRICO

Aunque el tipo histológico tumoral y el estadio patológico continúan siendo las variables con mayor importancia pronóstica en la práctica clínica para el tratamiento del cáncer gástrico, es evidente que tumores con morfología similar pueden tener comportamientos biológicos distintos con respecto a su agresividad, pronóstico y posible respuesta al tratamiento. El análisis molecular del cáncer gástrico, como el estudio del oncogén *HER2*, revela una asociación entre distintos rasgos clínico – patológicos y alteraciones genéticas que pueden servir para mejorar nuestro conocimiento y manejo de esta enfermedad.

### ESTUDIOS DE LA SOBREEXPRESIÓN DE HER2 EN CÁNCER GÁSTRICO

Los primeros trabajos sobre la amplificación del gen *HER2* y su sobreexpresión proteica fueron publicados en 1986 (Fukushige S 1986, Sakai K 1986). Desde entonces multitud de estudios han confirmado la presencia de amplificación y sobreexpresión de este oncogén y del receptor que codifica en cáncer gástrico. Si seleccionamos los estudios que incluyen más de 100 casos, obtenemos una cohorte de aproximadamente 6500 casos, lo que unido a los 3807 casos incluidos en el estudio ToGA, (Bang Y 2009) aporta información sobre la incidencia de sobreexpresión de *HER2* en una población de más de 10000 pacientes. Los resultados de estos estudios se resumen en la tabla 8.

Como puede apreciarse, existe un rango muy amplio de positividad entre los diferentes estudios que va desde el 8,25% (Takehana T 2002) hasta el 53,4% (Allgayer H 2000). La explicación de esta disparidad es multifactorial y parece

deberse, entre otros motivos, a las diferentes poblaciones estudiadas en cada trabajo, al empleo de técnicas diagnósticas no estandarizadas y al diferente criterio de interpretación de los resultados de la tinción inmunohistoquímica empleados por los investigadores. Asimismo, algunos autores (Chiu KY 1994, Risio M 2003) han reseñado la importancia que tienen el tipo de muestra y la fijación y conservación de la misma en la interpretación final de los resultados de inmunohistoquímica.

Referencia	N	Procedencia	% Sobreexpresión
Yonemura Y 1991	260	Japón	11,9
Roh JK 1992	109	Corea	31,0
Yonemura Y 1992	220	Japón	10,0
Uchino S 1993	214	Japón	9,8
Lee HR 1996	225	Corea	27,4
Shun CT 1996	112	Taiwan	30,3
Ooi A 1998	396	Japón	10,1
Ishikawa T 1997	375	Japón	10,4
Wu MS 1997	163	Taiwan	26,4
Allgayer H 2000	189	Alemania	53,4
Ougolkov A 2000	116	Japón	16,0
Sanz-Ortega J 2000	143	España	31,0
Wang YL 2002	100	Taiwan	32,0
Ghaderi A 2002	146	Iran	16,4
Takehana T 2002	352	Japón	8,2
Pinto-de-Sousa J 2002	157	Portugal	15,3
Lee KE 2003	841	Corea	17,0
Yano T 2006	200	Japón	23,0
Park DI 2006	182	Corea	15,9
Hofmann M 2008	168	China/Mexico/Alemania	10,7
Barros-Silva JD 2009	463	Portugal	9,3
Marx AH 2009	166	Alemania	16,9
Yu GZ 2009	1143	China	28
Bang YJ 2009	3807	Global	10,97

Tabla 8. Estudios de la sobreexpresión de HER2 en cáncer gástrico

Si establecemos una media ponderada de los casos incluidos en la tabla anterior, el porcentaje de pacientes con cáncer gástrico que presentan sobreexpresión de HER2 determinada por *IHQ* es del 19%. El análisis de las muestras incluidas en el estudio ToGA reveló una tasa de sobreexpresión de

entre el 10,39% y el 11,26% - según el tipo de muestra: endoscópica o pieza quirúrgica - y considerando los casos con resultado 2+ y 3+, empleando una interpretación centralizada de las muestras y de acuerdo a unos criterios previamente establecidos de manera específica para la determinación de HER2 en cáncer gástrico.

## ESTUDIOS DE LA AMPLIFICACIÓN DE *HER2* EN CÁNCER GÁSTRICO

Al igual que con la sobreexpresión del receptor, numerosos trabajos han investigado la amplificación del gen *HER2* en cáncer gástrico determinada mediante técnicas de hibridación *in situ*, fundamentalmente FISH o CISH. Los estudios más amplios se resumen en la tabla 9.

Aunque algo menor que en el caso de la sobreexpresión del receptor, sigue existiendo cierta disparidad de resultados, con tasas de casos amplificados que oscilan entre el 16% (Marx AH 2009) y el 27,1% (Yano T 2006). Probablemente esta mayor concordancia de resultados entre estudios se debe al carácter cuantitativo de las técnicas de hibridación *in situ* frente al semicuantitativo de la IHQ. La gran cantidad de casos analizados para su inclusión en el estudio ToGA ha proporcionado datos muy sólidos sobre la incidencia esperable de amplificación de *HER2* en cáncer gástrico, que en el citado estudio se situó entre el 24,36% en el caso de muestras endoscópicas y el 20,5% en las muestras de piezas quirúrgicas. La media ponderada del resto de estudios reseñados en la tabla alcanza el 19,4%.

Tabla 9. Estudios de la amplificación del oncogén *HER2* en cáncer gástrico

Referencia	Técnica	N	Procedencia	%Amplificación
Ishikawa T 1997	FISH	105	Japón	18,1
Tanner M 2005	CISH	231	Finlandia	17,3
Yano T 2006	FISH	199	Japón	27,1
Hofmann M 2008	FISH	168	China/México/Alemania	17,4
Marx AH 2009	FISH	166	Alemania	16,0
Bang YJ 2009	FISH	3807	Global	23,05

De manera esporádica y al igual que ocurre en el cáncer de mama, algunos de estos trabajos (Tanner M 2005, Marx AH 2009) han determinado la existencia de co-amplificación del gen de la Topoisomerasa II $\alpha$  (TOPII $\alpha$ ) en un porcentaje alto de casos con amplificación de *HER2*.

## CORRELACIÓN DEL ESTADO DE *HER2* EN CÁNCER GÁSTRICO CON OTRAS VARIABLES PATOLÓGICAS.

### RELACIÓN *HER2* Y TIPO HISTOLÓGICO

Desde los primeros trabajos realizados analizando el estado de *HER2* en cáncer gástrico se observó una mayor incidencia de casos con sobreexpresión proteica y/o amplificación del gen entre los tumores con tipo histológico intestinal de la clasificación de Laurén (Lin JT 1995, Wu MS 1997, Polkowski W 1999, Lemoine NR 1991). Esta correlación ha sido recientemente contrastada en cuatro estudios que recogen pacientes de diferentes áreas geográficas.

El estudio español denominado GastroHER (ver más adelante en el apartado de estudios clínicos Fase II), determinó el estado de *HER2* por *IHQ* o FISH en 228 pacientes con cáncer gástrico metastásico. Aunque un análisis preliminar

de 166 pacientes (Ballestin C 2007) mostró diferencias en la incidencia de casos con sobreexpresión proteica o amplificación del gen entre los de tipo intestinal (16%), difuso (7%) e indeterminado (14%) según la clasificación de Laurén, esta diferencia no resultó estadísticamente significativa en el análisis final del grupo completo (Grávalos C 2010, datos no publicados).

El grupo finlandés de Tanner y cols (Tanner M 2005) publicó un análisis de la incidencia, determinada mediante hibridación *in situ* cromogénica (CISH), de la amplificación de los genes *HER2* y *TOPII $\alpha$*  en 131 muestras de cáncer gástrico y 100 muestras de adenocarcinomas de la unión gastro-esofágica. Este estudio demostró una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.0051$ ) en el porcentaje de casos con amplificación del gen *HER2* y de tipo intestinal de Laurén (21,5%) y los casos amplificados pero de tipo difuso en dicha clasificación (2,2%).

En el año 2006 se presentó un estudio de la Universidad de Seúl (Park DI 2006) que analizaba la expresión de *HER2* en 182 muestras de cáncer gástrico obtenidas de piezas de gastrectomías realizadas con intención curativa. El porcentaje de casos con sobreexpresión proteica del receptor fue del 15,9%, mientras que los casos con amplificación del oncogén *HER2* fueron el 3,8%. El análisis estadístico reveló una diferencia estadísticamente significativa ( $p<0.005$ ) entre los casos amplificados de tipo intestinal (seis) y los de tipo difuso (uno).

Más recientemente, en 2009, se han conocido las diferencias en relación a la expresión del *HER2* en el estudio ToGA (Bang YJ 2009). En este estudio el porcentaje de casos de adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal con

sobreexpresión o amplificación positiva alcanzó el 32,2% del total, mientras que los casos con resultados positivos y de tipo histológico difuso fueron el 6,1%, diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0.001$ ).

La expresión y amplificación de *HER2* selectiva en los adenocarcinomas gástricos de tipo intestinal no tiene aún una explicación, pero se asemeja a lo habitualmente encontrado en cáncer de mama, donde la expresión y amplificación de *HER2* es más frecuente en los casos de carcinomas ductales infiltrantes y excepcional en los casos de tipo histológico lobulillar. Asimismo es de destacar cómo la presencia de la amplificación de *HER2* tiene una relación inversa con la existencia de mutaciones de *E-Cadherina* (Berx G 1998). Estas mutaciones son características de los adenocarcinomas gástricos difusos y de los carcinomas de mama lobulillares invasivos, pero muy infrecuentes en los tumores gástricos de tipo intestinal y en los carcinomas ductales de mama.

---

## RELACIÓN HER2 Y LOCALIZACIÓN TUMORAL

Al igual que con el tipo histológico de acuerdo a la clasificación de Laurén, la sobreexpresión del receptor HER2 o la amplificación del oncogén presenta diferencias notables en su incidencia según la localización del tumor primario dentro del estómago.

El estudio finlandés antes mencionado (Tanner M 2005) encontró una incidencia mayor en el porcentaje de casos amplificados por CISH en aquellos en los que el tumor se localizaba en la unión gastroesofágica (24%) frente al resto de localizaciones tumorales (12%).

Esta diferencia se encontró también en el primer análisis del estudio español GastroHER (Grávalos C 2007), aunque no alcanzó significación estadística en el análisis final

El estudio ToGA presentado en 2009 (Bang YJ 2009) sí demostró una diferencia amplia en la incidencia de sobreexpresión y/o amplificación de acuerdo a la localización tumoral. En este ensayo clínico la incidencia de casos positivos y localizados en la unión gastroesofágica fue del 33,2%, frente al 20,9% de casos con sobreexpresión/amplificación entre los tumores de otras localizaciones. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ).

#### CONCORDANCIA ENTRE LA SOBREEXPRESIÓN DE HER2 Y LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN *HER2* EN CÁNCER GÁSTRICO

Al igual que ocurrió con anterioridad en los estudios en cáncer de mama, la concordancia entre la sobreexpresión del receptor HER2 y la presencia de amplificación del gen *HER2* ha sido motivo de cierta controversia. En el momento actual, en los casos de cáncer de mama se considera que la sobreexpresión proteica es debida principalmente a la amplificación del gen *HER2*, lo que conlleva un aumento en la transcripción de dicho gen y, por tanto, un incremento en el número de receptores en la membrana celular (Pauletti G 1996, Lottner C 2005). La estandarización de los métodos de IHQ y FISH en cáncer de mama permite una correlación apropiada de sus resultados entre un 73% y un 98% de los casos (Schnitt SJ 2001).

En los adenocarcinomas gástricos, la concordancia entre la expresión proteica y la amplificación de *HER2* ha sido estudiada en varios trabajos con resultados diversos.

Los primeros estudios fueron publicados en 1990 y 1991 y no evidenciaron una concordancia elevada entre ambos métodos diagnósticos. En una serie de 40 casos (Lemoine NR 1991) se encontró sobreexpresión de *HER2* en un 26% de los casos, pero sólo un 13% mostraba al mismo tiempo amplificación génica. Un resultado similar se obtuvo en un trabajo publicado el año anterior (Kameda T 1990), en el cual se detectaba sobreexpresión de *HER2* en diversas zonas de la muestra tumoral analizada así como en el tejido no neoplásico acompañante. A pesar del pequeño número de muestras analizadas en este trabajo, sólo 34 casos, se objetivó en alguno de ellos la existencia de sobreexpresión proteica sin amplificación del gen. Estos resultados plantearon la posibilidad de que la amplificación del oncogén no fuese el principal mecanismo por el cual se produce la sobreexpresión del receptor en la membrana celular, pudiendo estar implicados otros sucesos post-transcripcionales o mecanismos de activación de la transcripción mediados por otros genes diferentes (Hollywood DP 1993).

Más recientemente se han publicado los resultados de diversos estudios que emplean métodos IHQ y FISH estandarizados y que han permitido aclarar la correlación existente entre sobreexpresión proteica y amplificación génica de *HER2* (Ooi A 1997, Ishikawa T 1997, Takehana T 2002, Yano T 2006, Park DI 2006, Hofmann M 2008, Barros-Silva JD 1009, Marz AH 2009). De estos trabajos se deduce que cuando se realiza un análisis correcto de concordancia,



los resultados de ambas técnicas coinciden en un porcentaje elevado de casos, entre un 86,9% y un 96,4%

En cuatro de estos trabajos se estudió inicialmente la incidencia de sobreexpresión de HER2 en pacientes con adenocarcinoma gástrico y, posteriormente, se analizó la existencia ó no de amplificación del gen en los casos con IHQ positiva. En todos ellos se comprobó cómo la sobreexpresión del receptor va asociada a la amplificación del gen *HER2*, incluyendo una concordancia del 100% en uno de ellos (Ooi A 1997).

Los resultados de estos estudios parecen indicar que, al igual que ocurre en el cáncer de mama, la amplificación del oncogén *HER2* determina la sobreexpresión proteica del receptor HER2.

Aun más recientemente se han conocido los resultados de la correlación entre los resultados de IHQ y FISH en los 3807 pacientes incluidos en el ensayo ToGA (Bang YJ 2009). Aunque todos los casos fueron evaluados de manera centralizada y siguiendo unas directrices de consenso previamente establecidas, la concordancia de resultados entre ambas técnicas alcanzó solo el 87,3%. A pesar de ser un resultado similar a los previamente publicados, en este estudio se evidenció un porcentaje elevado de casos con IHQ negativa (0,1+) pero con amplificación del gen *HER2* (23% de los casos). Este tanto por ciento es similar al de pacientes con IHQ positiva débil (2+) (26%) y muy superior a lo establecido en las guías de evaluación de HER2 en cáncer de mama (0%-8%) (Wolff AC 2007). Estos datos nuevos han cuestionado otra vez la relación directa entre la amplificación de *HER2* y la sobreexpresión proteica del mismo y su similitud con lo descrito para el carcinoma de mama.

## SOBREEXPRESIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE *HER2* COMO FACTOR PRONÓSTICO Y PREDICTIVO EN CÁNCER GÁSTRICO

El posible carácter pronóstico del oncogén *HER2* en cáncer gástrico es un tema controvertido por los diferentes resultados entre unos estudios y otros a la hora de determinar la existencia (o no) de una relación entre la evolución de la enfermedad y la sobreexpresión y/o amplificación del mismo. De igual manera, aunque se han presentado diversos trabajos analizando el estado de *HER2* como factor pronóstico en cáncer gástrico, hasta la fecha (y con la excepción del ensayo ToGA presentado en el Congreso Americano de Oncología en 2009 y pendiente de su publicación definitiva) no se ha publicado ningún estudio que determine el carácter predictivo de respuesta a un tratamiento dirigido frente al receptor *HER2*, de la sobreexpresión del mismo o de la amplificación del oncogén.

Entre los años 1990 y 1999, se publicaron algunos estudios con resultados dispares. Unos no encontraron ninguna relación significativa entre la expresión de *HER2* y el pronóstico de los pacientes con cáncer gástrico (Tateishi M 1992, Sasano H 1993); por el contrario, otros estudios (Uchino S 1993, Mizutani T 1993, Nakajima M 1999) sí encontraron una correlación entre la presencia de sobreexpresión de *HER2* o su amplificación génica y un pronóstico peor, determinado fundamentalmente por una mayor incidencia de metástasis ganglionares, un tamaño tumoral mayor al diagnóstico y una supervivencia a los 10 años inferior en aquellos pacientes con sobreexpresión / amplificación positiva.

En los últimos 10 años el número de estudios de la sobreexpresión y/o amplificación de *HER2* en cáncer gástrico ha aumentado así como el tamaño muestral de dichos trabajos (ver tablas 8 y 9). La mayoría de estos estudios realizan análisis retrospectivos de series de pacientes tratados con cirugía radical con intención curativa, escrutando entre otros parámetros el papel pronóstico de *HER2*.

En el año 2000 se publicó un estudio de la incidencia de sobreexpresión de *HER2* tanto citoplasmática como membranosa en una muestra de 203 pacientes (Allgayer H 2000). Este trabajo encontró una incidencia altísima de sobreexpresión de *HER2* (91% de los casos) probablemente debido al empleo de un test de detección de *HER2* altamente sensible y a la consideración de casos como positivos independientemente de si la tinción IHQ se localizaba en la membrana celular (como en los estudios previos) o en el citoplasma. En este estudio se evidenció una asociación significativa entre la sobreexpresión de *HER2* determinada por IHQ y una supervivencia global y libre de enfermedad menor.

Un estudio finlandés publicado en 2005 (Tanner M 2005) analizó la relación entre la amplificación de *HER2* medida por hibridación *in situ* cromogénica (CISH) y la evolución de 231 pacientes intervenidos por cáncer gástrico (131 casos) o cáncer de la unión gastroesofágica (100 casos). La presencia de amplificación de *HER2* se asoció con una supervivencia global menor (12,7 meses, no amplificados vs 6,6 meses, amplificados) pero no alcanzó significación estadística (p 0.37). Resultados similares fueron publicados en 2003 por autores españoles (Garcia I 2003) empleando una técnica de ELISA

para determinar la expresión proteica de HER2 en una cohorte de 65 pacientes con cáncer gástrico en esta ocasión inoperable.

Por el contrario, un estudio coreano publicado en 2006 (Park DI 2006) y que analizó la sobreexpresión de HER2 por IHQ y la amplificación del oncogén por CISH y FISH en un grupo de 186 pacientes sometidos a cirugía con intención curativa, sí encontró una relación estadísticamente significativa entre la presencia de *HER2* amplificado y una supervivencia global menor (supervivencia global a los 5 años, 21% vs 63% en los no amplificados  $p < 0.05$ ).

Finalmente, debemos reseñar el trabajo publicado este mismo año 2010 (Grabsch H 2010) por las universidades de Leeds y Düsseldorf que analiza la expresión de HER2 en 924 casos procedentes de dos series independientes (una alemana y otra inglesa). El análisis de la expresión de HER2 se realizó de manera estandarizada empleando el anticuerpo antiHER2 CB11 y usando Dako Envisión Kit® como método de detección. Los resultados de este trabajo muestran, además de una gran heterogeneidad intratumoral, una mayor incidencia de sobreexpresión de HER2 en los casos de tipo intestinal en la clasificación de Laurén, sin que esta sobreexpresión esté relacionada de manera significativa con ningún otro parámetro clínico-patológico ni con la supervivencia global de los pacientes.

## ESTUDIOS PRECLÍNICOS CON FÁRMACOS DIRIGIDOS CONTRA HER2

Antes de completarse el desarrollo clínico de Trastuzumab, primer anticuerpo monoclonal dirigido frente al receptor HER2 que se ha utilizado en humanos, han sido publicados diversos ensayos preclínicos que demuestran la actividad antitumoral de este fármaco tanto en monoterapia como en combinación con agentes citotóxicos.

Los primeros estudios preclínicos *in vitro* e *in vivo* se comunicaron en 1992 y en ellos se empleó una combinación de 2 anticuerpos monoclonales antiHER2 (Kasprzyk PG 1992). En este primer estudio se constató el efecto inhibitorio *in vitro* que estos fármacos ejercían sobre el crecimiento de la línea celular de cáncer gástrico NCI-N87 e, *in vivo*, sobre xenoinjertos derivados de esta línea celular e implantados en ratones atímicos. Esta línea celular NCI-N87 fue elegida al mostrar expresión de HER2 por inmunohistoquímica y amplificación del gen determinada por FISH, al igual que ocurre con la línea celular 4-1ST.

En 2005 se publicó un estudio (Tanner M 2005) en el cual se comparaba la sensibilidad al tratamiento con Trastuzumab de la línea celular de cáncer gástrico NCI-N87 frente a la de la línea de cáncer de mama SKBR-3, que también muestra amplificación de *HER2* medida por FISH. *In vitro* ambas líneas celulares fueron inhibidas por Trastuzumab con igual eficacia. Asimismo, se comprobó cómo la dosis de 5 mgr/Kg administrados semanalmente era capaz de inhibir tanto el crecimiento celular *in vitro* de la línea NCI-N87 como el crecimiento *in vitro* de los xenoinjertos derivados de la misma. Este resultado contrasta con el publicado el año anterior por el grupo de la Universidad de

Seúl (Gong SJ 2004), trabajo en el cual Trastuzumab no fue capaz de inhibir el crecimiento de ninguna de las tres líneas celulares con sobreexpresión de HER2 testadas (YCC-2, NCI-N87, YCC-3). Esta falta de actividad del fármaco, tanto en monoterapia como cuando se administró en combinación con Doxorrubicina, Cisplatino o Paclitaxel, fue atribuida al empleo en este estudio de una concentración de Trastuzumab insuficiente para conseguir su efecto biológico. La adición de Doxorrubicina a una pauta de administración de Trastuzumab durante 5 días consecutivos sí fue capaz de demostrar cierta actividad antitumoral sinérgica y es la primera evidencia que se tiene del efecto de un fármaco dirigido frente a HER2 asociado a un agente citotóxico en cáncer gástrico.

Matsui y cols publicaron en 2005 un trabajo en el que testaban la sensibilidad de cuatro líneas celulares con diferente nivel de expresión de la proteína HER2 (N87, MKN-45P, Kato-III y MKN-1) al tratamiento con Trastuzumab (Matsui Y 2005). Su trabajo confirmó la eficacia de Trastuzumab a la hora de inhibir *in vitro* el crecimiento de estas líneas celulares con sobreexpresión de HER2, así como lograron aumentar en experimentos *in vivo* la supervivencia de ratones con carcinomatosis peritoneal inducida con dichas líneas tumorales.

Más recientemente, dos grupos de investigadores asiáticos (Kim SY 2008, Fujimoto-Ouchi 2007) han comprobado el efecto sinérgico de la administración de Trastuzumab en combinación con quimioterapia en líneas celulares derivadas de cáncer gástrico humano. Kim y cols testaron Trastuzumab frente a diez líneas celulares de carcinomas humanos tratados en su propia institución y de las cuales sólo una, SNU-216, mostraba amplificación de *HER2*, utilizando como controles positivos las líneas de cáncer gástrico NN87 y

de cáncer de mama SK-BR3 con amplificación de *HER2* conocida. El tratamiento con Trastuzumab inhibió el crecimiento de la línea celular SNU-216 así como de los controles positivos, sin tener ninguna eficacia en las líneas celulares sin amplificación del gen *HER2*. La administración conjunta de Trastuzumab y Cisplatino resultó sinérgica, de manera similar a lo obtenido en experimento similares con cáncer de mama. De modo complementario se obtuvo evidencia del efecto aditivo que supone la administración de Trastuzumab y 5-Fu ó Trastuzumab y Oxaliplatino.

Fujimoto-Ouchi observó cómo en las líneas celulares NCI-N87 y 4-1ST, el patrón de tinción inmunohistoquímica de HER2 en la membrana periférica de las células y los ratios de amplificación del gen por FISH eran equiparables a los obtenidos en la línea celular KPL-4 de cáncer de mama, en la cual la actividad antitumoral de Trastuzumab es conocida. *In vitro* demostró el efecto anti-proliferativo directo e indirecto del Trastuzumab en monoterapia en las líneas celulares NCI-N87 y 4-1ST, así como su eficacia in vivo en ratones con xenoinjertos derivados de la misma. Por el contrario, Trastuzumab no demostró ninguna actividad en este estudio frente a las líneas celulares GXF97 y MKN-45, líneas de cáncer gástrico sin expresión ni amplificación de *HER2*. Asimismo, se comprobó la mayor actividad antitumoral de la combinación de Trastuzumab con Capecitabina, Cisplatino, Irinotecan, Docetaxel o Paclitaxel. En cualquiera de las combinaciones mencionadas, el efecto antitumoral fue mayor que el conseguido con la administración del agente citostático en monoterapia, siendo especialmente notable la actividad antineoplásica del esquema Trastuzumab, Cisplatino y Capecitabina. Esta triple terapia logró una inhibición del crecimiento tumoral (medida el día 22 de la administración del

tratamiento) del 108%, mayor que la demostrada por Trastuzumab en monoterapia (63%), Cisplatino más Trastuzumab (85%) o Cisplatino y Capecitabina (82%).

Más recientemente se ha comunicado la actividad de Lapatinib, fármaco que inhibe la actividad Tirocin Kinasa de los receptores HER1 (ó EGFR) y HER2, frente a líneas celulares de cáncer gástrico (Kim JW 2008). Ésto ha llevado al desarrollo de ensayos clínicos con este nuevo fármaco en cáncer gástrico, sin que hasta el momento se hayan publicado resultados definitivos.

## ESTUDIOS CLÍNICOS CON FÁRMACOS DIRIGIDOS CONTRA HER2

### CASOS INDIVIDUALES COMUNICADOS.

Con la excepción de los ensayos clínicos GastroHER y ToGA, la información sobre el empleo de Trastuzumab en pacientes con cáncer gástrico proviene de unos pocos casos individuales publicados. El primero de ellos (Rebischung C 2005) fue una paciente joven con un adenocarcinoma gástrico metastásico con una afectación extensa de la pared abdominal y con sobreexpresión de HER2 determinada por inmunohistoquímica (Dako Herceptest®: 3+). Como 3ª línea de tratamiento recibió la combinación de Trastuzumab y Oxaliplatino, lográndose una remisión completa de la enfermedad a los 3 meses del tratamiento, manteniendo posteriormente Trastuzumab en monoterapia durante 18 meses. Ante una posterior progresión tumoral a nivel pulmonar, la paciente recibió tratamiento con Capecitabina y Trastuzumab, lográndose una estabilización de la enfermedad de 12 meses de duración.



El segundo caso comunicado (Inui T 2006) corresponde a un paciente varón de edad avanzada y con un adenocarcinoma gástrico con metástasis hepáticas que mostraba tanto sobreexpresión del receptor como amplificación del oncogén *HER2*. Este paciente recibió Trastuzumab en monoterapia logrando una remisión parcial de su metástasis hepática, respuesta que se transformó en completa tras administrar tratamiento radioterápico con protones y Trastuzumab como terapia de mantenimiento durante más de 2 años. El paciente falleció finalmente por complicaciones infecciosas no relacionadas con el tumor ni con el tratamiento administrado.

---

## ENSAYOS FASE II

En el año 2006 se comunicaron los primeros resultados de ensayos clínicos no randomizados fase II en pacientes con cáncer gástrico tratados con Trastuzumab.

Un estudio piloto de Trastuzumab en monoterapia como tratamiento de 2ª línea (Rech J 2006), en pacientes con sobreexpresión fuerte (3+) o sobreexpresión moderada (2+) y amplificados (FISH ratio  $\geq 2$ ), fue presentado en el Congreso Europeo de Oncología de 2006. Se incluyeron 33 pacientes de los cuales sólo 5 (15,15%) mostraban sobreexpresión / amplificación y fueron incluidos para tratamiento. De estos 5 pacientes, 3 recibieron tratamiento con Trastuzumab (dosis de carga 4 mgr/Kg seguida de dosis semanales de 2 mgr/Kg), documentándose una respuesta parcial mantenida en uno de los pacientes.

En ese mismo congreso se publicaron los resultados de un ensayo fase II que empleaba la combinación de Trastuzumab, Cisplatino y Docetaxel en pacientes con cáncer gástrico con amplificación de *HER2* determinada por FISH o

sobreexpresión del HER2 por inmunohistoquímica (Nicholas G 2006). De los 55 pacientes valorados inicialmente, 9 (16%) tuvieron un resultado positivo y 5 de ellos fueron finalmente incluidos en el estudio. Se obtuvo una respuesta completa y 3 respuestas parciales tras la administración de entre 5 y 11 ciclos de tratamiento.

Lamentablemente no se han publicado resultados actualizados de estos dos estudios por lo cual sólo pueden considerarse como estudios iniciales e inconclusos.

El primer estudio fase II amplio en cáncer gástrico HER2 positivo (Cortes-Funes H 2007), con resultados comunicados internacionalmente y pendiente de su publicación definitiva en el momento actual, fue llevado a cabo en España por un grupo multicéntrico. Este ensayo fue denominado GastroHER y en él se determinó el estado del receptor HER2 por IHQ ó la posible amplificación del gen en 228 pacientes con cáncer gástrico metastásico y sin tratamiento previo para su enfermedad diseminada. De éstos, 22 pacientes (10%) mostraron amplificación de *HER2* por FISH y sobreexpresión moderada o fuerte por IHQ y recibieron tratamiento con Trastuzumab (dosis de carga 8 mgr/Kg seguida de 6 mgr/Kg cada 3 semanas) y Cisplatino (75 mgr/m<sup>2</sup> cada 3 semanas).

La edad media de los paciente incluidos fue de 66 años y todos los pacientes presentaban un buen estado general y funcional (ECOG 0-1). La mediana de ciclos administrados fue de 4 (rango 1 - 41), obteniéndose una tasa de respuestas objetivas (completas más parciales) del 33%, y un control de la enfermedad (respuestas objetivas más estabilizaciones de enfermedad) en el 64% de los casos. La mediana del tiempo a la progresión tumoral obtenida fue

de 5,1 meses (IC95% 3.3 – 6.9 meses) y la de supervivencia global de 12.9 meses (IC95% 9.1 – 16.6 meses), claramente superior a lo obtenido con esquemas de quimioterapia estándar hasta la fecha. La tolerancia al tratamiento administrado fue adecuada, sin objetivarse toxicidades severas significativas y siendo los efectos adversos más frecuentes: astenia (27% de los pacientes), neutropenia (18%), anorexia (14%), diarrea (9%) y dolor abdominal (9%). En este estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de adenocarcinomas gástricos con sobreexpresión o amplificación de *HER2* según la localización del tumor primario dentro del estómago, ni tampoco la relación entre dicho parámetro y el tipo histológico de acuerdo a la clasificación de Laurén (Ballestin C 2007).

---

## ENSAYOS FASE III

---

### ENSAYO ToGA

El único ensayo clínico randomizado fase III comparando el tratamiento con un esquema quimioterápico estándar como Cisplatino/5-Fu ó Cisplatino/Capecitabina vs la combinación de quimioterapia y un agente dirigido frente a *HER2* es el denominado ensayo ToGA (Trastuzumab on Gastric Cancer).

Este estudio fue llevado a cabo de manera multicéntrica en 24 países de Asia, Sudáfrica, Australia, Europa, Centroamérica y América del Sur. En este ensayo se incluyeron pacientes con sobreexpresión 3+ de *HER2* medida por *IHQ* o con amplificación de *HER2* determinada por FISH, ratio  $\geq 2$ . Las determinaciones fueron realizadas de manera centralizada en un laboratorio de referencia y, previamente al desarrollo de este estudio, se estableció un consenso entre los patólogos participantes sobre la manera de interpretar los resultados *IHQ* a la

hora de establecer la positividad para HER2 de un caso de adenocarcinoma gástrico. Como se describe en el apartado de “Métodos de determinación del estado de HER2” en esta tesis, las diferencias en la interpretación con respecto a los casos de cáncer de mama fueron significativas.

Tras realizar el cribado mediante *IHQ* y FISH a 3807 posibles candidatos, de los cuales 810 presentaron finalmente sobreexpresión del receptor o amplificación del gen *HER2*, se incluyeron en el estudio 594 pacientes. Éstos fueron randomizados a recibir Cisplatino y 5-Fu o Cisplatino y Capecitabina (a criterio del investigador) ó el mismo esquema quimioterápico más Trastuzumab (dosis de carga 8 mgr/Kg, seguido de 6 mgr/kg), todo ello administrado cada 3 semanas. El objetivo principal del estudio era encontrar una diferencia significativa en la supervivencia global de los pacientes a favor de la rama experimental con Trastuzumab y, entre los objetivos secundarios, un aumento en la tasa de respuestas objetivas al tratamiento y en el intervalo libre de progresión tumoral.

Tras un seguimiento medio de 17,1 meses para la población total del estudio los resultados fueron comunicados en el Congreso Americano de Oncología Clínica en Junio de 2009 (Van Cutsem E 2009, Bang YJ 2009).

Este trabajo encontró una diferencia estadísticamente significativa en la tasa de positividad para HER2 por *IHQ* y/o FISH a favor de los adenocarcinomas de tipo intestinal vs difusos (32.3% vs 6.1% respectivamente), así como una incidencia mayor de casos positivos en los tumores localizados en la unión gastroesofágica frente al resto de localizaciones tumorales (33.2 % vs 20.9%).

La concordancia entre los resultados del análisis *IHQ* y el análisis por FISH del estado de HER 2 fue del 87,3%.

El resultado principal del estudio fue alcanzado, logrando la adición de Trastuzumab al tratamiento quimioterápico estándar un incremento en la supervivencia global de 2,7 meses (de 11,1 en la rama control a 13,8 en la rama experimental con Trastuzumab), lo que se corresponde con un Hazard Ratio (HR) de 0.74 (IC95% 0.60 – 0.91,  $p=0.0046$ ). De igual manera, se cumplieron los objetivos secundarios del estudio aumentando el tiempo libre de progresión tumoral de 5,5 meses a 6,7 meses (HR 0.71 IC95% 0.59 – 0.85,  $p=0.002$ ), e incrementando la tasa de respuestas tumorales objetivas del 35,5% en la rama de quimioterapia estándar al 47,3% en la rama que incluía Trastuzumab ( $p=0.0017$ ).

Un subanálisis de este estudio incluyendo únicamente aquellos casos con resultado *IHQ* 3+ o *IHQ* 2+ y amplificación determinada por FISH concluyó que la eficacia del tratamiento puede ser mayor en este subgrupo con expresión del receptor más intensa, al objetivar un incremento en la supervivencia global de 4,2 meses en el grupo que recibió Trastuzumab (11,8 meses en brazo control vs 16,0 meses en el brazo experimental con HR 0.65 IC95% 0.51 – 0.85). Ésta diferencia con los datos de la población total del estudio no está totalmente explicada pero parece guardar relación con la relativamente baja concordancia entre los resultados del estudio *IHQ* y el FISH (87,3%) y el porcentaje elevado de casos negativos por *IHQ* (0 ó 1+) y con amplificación de *HER2* comprobada por FISH (131 pacientes que corresponden al 22,05% del total de pacientes incluidos en el ensayo).

La tolerancia al tratamiento fue adecuada, no existiendo diferencias significativas en la toxicidad hematológica ni extrahematológica entre las dos ramas del estudio, a excepción de una mayor incidencia de descensos asintomáticos en la fracción de eyección del ventrículo izquierdo en el grupo que recibió Trastuzumab. Un análisis posterior de la calidad de vida de los pacientes incluidos en el ensayo tampoco encontró diferencias entre las dos ramas del estudio (Sato T 2010).

## MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DEL ESTADO DEL ONCOGÉN *HER2*

El oncogén *HER2/neu* localizado en el cromosoma 17 codifica una proteína transmembrana de 185 kDa (p185) y forma parte de la familia de receptores con actividad tirosina kinasa que incluyen al Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico. La sobreexpresión de esta proteína ocurre en un 18% a 20% de los casos de cáncer de mama y se asocia con un pronóstico peor debido a una agresividad tumoral mayor y una supervivencia menor (Penault-Llorca F 2005, Slamon DJ 1987, Slamon DJ 1989). Asimismo tiene un indudable valor predictivo no sólo de la respuesta a Trastuzumab, (anticuerpo monoclonal frente al propio HER2), sino que su positividad se asocia a una mayor probabilidad de respuesta tumoral con el empleo de antraciclinas y una pobre respuesta a los tratamientos hormonales (Borg Å 1990, Gusterson BA 1992, Paik S 1998, Paik S 2001, Masood S 2002). Diversos estudios han demostrado la estrecha correlación entre la amplificación del gen *HER2* y la sobreexpresión patológica de la proteína que éste codifica (Hoang MP 2000, Nagai MA 1993, Pauletti G 1996, Tubbs RR 2000, Vaziri SA 2001, Bartlett J 2001), siendo la concordancia entre resultados estadísticamente significativa (Dybdal N 2005, Press M 2005, Pauletti G 2000, Ciampa A 2006, Jacobs T 1999, Owens MA 2004, Perez E 2006, Yaziji H 2004). En el momento actual disponemos de suficientes datos que demuestran una separación neta entre los niveles patológicos de sobreexpresión en los casos de cáncer de mama con amplificación génica y aquellos casos sin dicha amplificación. En las células con amplificación se pueden encontrar entre 500.000 a 2.000.0000 de receptores HER2 por célula, mientras que en las células sin amplificación del

gen el rango se sitúa entre 25.000 a 185.000 receptores por célula (Konecny G 2003).

La proteína es la diana terapéutica de Trastuzumab y otros fármacos (Lapatinib, Pertuzumab, etc...), siendo Trastuzumab el primer anticuerpo monoclonal dirigido frente a HER2 que ha demostrado incrementar la supervivencia en pacientes con cáncer de mama o cáncer gástrico cuando se administra en conjunto con quimioterapia estándar. La determinación adecuada del status de HER2 es fundamental para identificar aquellos pacientes que se pueden beneficiar del tratamiento dado que la probabilidad de responder al mismo está directamente relacionada con el nivel de sobreexpresión del receptor y/o con la amplificación génica de *HER2*. Tanto en cáncer de mama como en cáncer gástrico el beneficio terapéutico lo obtienen sólo aquellos pacientes con mayor sobreexpresión de HER2 determinada por inmunohistoquímica o aquellos cuyos tumores muestran amplificación génica determinada por técnicas de hibridación *in situ*. Más aun, existen algunos estudios que relacionan directamente el nivel de amplificación de *HER2* con el grado de respuesta antitumoral obtenida, tanto en al caso del tratamiento neoadyuvante del cáncer de mama como en el tratamiento del cáncer gástrico avanzado (Arnould L 2007, ToGA Trial Van Cutsem 2009 datos no publicados).

Se han empleado diversos procedimientos para determinar el status de HER2 entre los que se encuentran; Western Blot, ELISA e inmunohistoquímica para la valoración de la proteína, Northern Blot para el estudio de mRNA y Southern Blot, RT-PCR y técnicas de hibridación *in situ* (FISH, CISH, SISH) para el análisis del ADN del gen. En el momento actual sólo existen 2 técnicas validadas, aprobadas por las agencias reguladoras (FDA, EMEA) y



ampliamente difundidas como métodos diagnósticos en la práctica diaria. Por un lado el análisis inmunohistoquímico que identifica la expresión de la proteína HER2 en la superficie celular. Por otro lado el FISH (hibridación *in situ* fluorescente) que determina de manera cuantitativa el grado de amplificación del gen *HER2*.

## INMUNOHISTOQUÍMICA

Para la determinación inmunohistoquímica (IHQ) de la expresión de HER2 se emplean anticuerpos mono o policlonales que reconocen distintos epítomos de la proteína p185. El patrón de tinción de las células tumorales es evaluado de acuerdo con un sistema de interpretación especialmente desarrollado para esta técnica. Los estudios iniciales de HER2 en cáncer de mama emplearon los anticuerpos monoclonales CB11 y 4D5 con protocolos que eran validados en cada centro. En el momento actual existen 2 métodos de estudio IHQ comercializados y aceptados internacionalmente: HercepTest® (Dako, Carpinteria, California USA) y Pathway® HER-2/neu (4B5) (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA). El HercepTest® emplea el anticuerpo policlonal A085 y, de acuerdo con el fabricante, se considera un caso HER2 débilmente positivo (2+) cuando se objetiva una tinción débil a moderada pero completa de la membrana celular en más del 10% de las células, siendo un caso positivo (3+) cuando existe una tinción fuerte y completa de toda la membrana en más del 10% de las células tumorales. En el caso de Pathway® HER-2/neu (4B5), se emplea el anticuerpo monoclonal 4B5 que se une a un epítomo perteneciente al dominio intracitoplasmático del receptor. Al igual que en el caso del HercepTest® la interpretación del resultado se hace de acuerdo

a una escala (0, 1+, 2+, 3+) considerándose un caso débilmente positivo (2+) cuando se tiñe de manera débil pero completa la membrana de más del 10% de las células tumorales, y un caso positivo (3+) aquel en el cual se evidencia una tinción intensa y completa de la membrana de más del 10% de las células. Los casos débilmente positivos (2+) se clasifican como *borderline* o equívocos y se considera que deben ser comprobados mediante técnicas de amplificación génica (Wolff AC 2007), aunque existe cierta discordancia al respecto y algunos autores (Sauter G 2009) defienden la realización de técnicas de hibridación de manera primaria sin cribado inmunohistoquímico previo.

La IHQ como método diagnóstico del status de HER2 es una técnica sencilla, rápida y relativamente barata, que se lleva a cabo en la mayoría de los laboratorios de Anatomía Patológica empleando únicamente microscopios de campo claro estándar. Las muestras teñidas pueden almacenarse por periodos largos de tiempo y ser posteriormente reevaluadas, así como permite un control morfológico de las células tumorales a analizar. Como principales desventajas debemos resaltar que es una técnica susceptible de variabilidad interobservador debida a la subjetividad inherente a la interpretación de una escala semicuantitativa de tinción. Además, el resultado puede alterarse por variaciones en el protocolo de tinción empleado y, sobre todo, por alteraciones en la fase pre-analítica relacionadas con problemas en la fijación del tejido y con la conservación de las muestras parafinadas por tiempos prolongados.

Recientemente se han publicado guías de consenso y recomendaciones para análisis IHQ de HER2 en cáncer de mama tanto a nivel nacional (Palacios J 2009) como internacional (Wolff AC 2007). Aunque sigue siendo motivo de controversia, estas guías han determinado los estándares a seguir con

respecto al desarrollo, validación e interpretación de los resultados. En relación a este último punto, es de destacar que el porcentaje de células tumorales con tinción completa de la membrana necesarias para considerar un caso positivo (3+) se ha elevado al 30% frente al 10% inicialmente empleado y recomendado por el fabricante.

En el caso del cáncer gástrico la determinación del status de HER2 resulta más compleja al existir menos estudios en la literatura y ser un tumor notablemente más heterogéneo que el cáncer de mama. Al igual que ocurrió inicialmente en las neoplasias de mama el rango de casos positivos por IHQ oscilaba según las series entre el 6,8% y el 34% (Takehana T 2002, Aoyagi K 2001). En 2008 se publicó por el grupo alemán (Hoffman M 2008) un documento de consenso en el que se recogen una serie de modificaciones en el desarrollo e interpretación del Herceptest® para los tumores gástricos. Estas modificaciones tienen en cuenta la heterogeneidad anatomopatológica del cáncer de estómago y las características diferenciales de sus células. De esta manera modifican la necesidad de una tinción completa de la membrana celular para aceptar como positiva una tinción únicamente de la membrana basolateral y reducen el porcentaje de células tumorales que deben teñirse claramente para ser considerado un caso como positivo (3+) al 10% de las células; e incluso a un pequeño agregado de células, independientemente de su porcentaje respecto del total de la muestra, en los casos de muestras patológicas procedentes de biopsias endoscópicas.

## FISH (Hibridación *in situ* Fluorescente)

El FISH es una técnica que permite la localización de una secuencia de ADN de un gen o cromosoma en una preparación tisular, mediante el anillamiento de una cadena simple de ADN marcada con fluorescencia a la secuencia diana complementaria. El FISH de HER2 es un método sensible y específico que identifica el número de copias del gen *HER2* así como el número de copias del centrómero del cromosoma 17 (CEP17) si utilizamos sondas duales. Existen tres métodos de FISH para HER2 comercializados y aprobados en EEUU y Europa: PathVysion HER2 DNA® kit (Vysis, Abbott Laboratories, Abbott Park IL, USA) que emplea una sonda de hibridación naranja (Orange) para el gen *HER2* y una sonda verde (FITC) para el centrómero del cromosoma 17 (CEP17); INFORM HER2/neu Probe® (Ventana Medical Systems, Tucson AZ, USA) que emplea una única sonda fluorescente para la detección de *HER2* y HER2 FISH pharmDx® kit (Dako, Carpinteria, California, USA) que emplea al igual que PathVysion dos sondas de hibridación, una roja (Texas Red) para el gen y otra verde (FITC) para el centrómero del Cr17.

Esta técnica puede realizarse en secciones estándar (4 – 5 µm) de muestras parafinadas o incluso sobre extensiones citológicas o fluidos. La valoración del resultado es cuantitativa y se expresa como el número de copias del gen *HER2* en los casos de FISH sin control centromérico y como el ratio resultante de dividir el número de copias del gen frente al número de copias del centrómero del cromosoma 17 cuando se emplean 2 sondas, una específica para HER2 y otra para el centrómero.

En las guías nacionales e internacionales para la determinación de HER2 en cáncer de mama, cuando se usa hibridación fluorescente sin control centromérico se considera un resultado positivo, es decir, existe amplificación del gen *HER2*, si se detectan más de 6 copias del gen por núcleo; considerándose *borderline* si el número está entre 4 y 6 copias/núcleo y no amplificado si se detectan menos de 4 copias del gen/núcleo. En las técnicas de FISH realizadas con control centromérico, se considera un cáncer de mama amplificado para *HER2* cuando el ratio es  $\geq 2.2$ . Las neoplasias con ratios entre 1.8 y 2.2 se clasifican como *borderline*, recomendándose la observación de un mayor número de núcleos, la evaluación por un segundo observador y/o la repetición de la prueba sobre otra sección. Este algoritmo diagnóstico no se aplica en la actualidad al resto de neoplasias donde un ratio  $\geq 2$  se considera amplificación para *HER2*.

Al ser el ADN más estable que las proteínas, los factores pre-analíticos (fijación de la muestra, conservación, etc...) tienen menos impacto sobre el resultado del FISH que sobre el de la IHQ. Asimismo la interpretación del resultado es más objetiva y con menor variabilidad interobservador que la IHQ, permitiendo identificar aquellos casos con resultado IHQ dudoso (2+) y que presenten amplificación del gen *HER2*. Las principales desventajas del FISH son la falta de control morfológico directo del área en que se determina la posible amplificación, el coste económico dado que requiere un microscopio de fluorescencia y la pérdida de la señal fluorescente con el tiempo si no se respeta su conservación refrigerada a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Recientemente se ha publicado el resultado de un estudio que compara los resultados de FISH interpretados de manera manual frente al resultado obtenido empleando un programa

automatizado de análisis morfométrico de la imagen, siendo la correlación entre ambos resultados muy buena ( $r^2=0.90$ ), lo que permite reducir el tiempo empleado en la realización de esta técnica (Barry TS 2007).

El FISH de HER2 en cáncer gástrico ha mostrado, al igual que los estudios de IHQ, una gran disparidad de resultados entre las distintas series publicadas. La tasa de casos amplificados (ratio HER2/CEP17  $\geq 2$ ) varía entre el 7,1% y el 42,6% (Takehana T 2002, Brien TP 1998) como hemos referido en el capítulo correspondiente, aunque todos los trabajos coinciden en la mayor positividad de los casos de carcinoma de tipo intestinal de la clasificación de Laurén frente a los de tipo difuso. La existencia de casos con rasgos indeterminados e incluso mixtos de ambos tipos histológicos es uno de los principales inconvenientes para la realización del FISH de HER2 en cáncer gástrico, al no disponer de control morfológico directo y simultáneo de la zona que se analiza en el microscopio de fluorescencia.

#### CISH (Hibridación *in situ* Cromogénica)

El CISH (Hibridación *in situ* cromogénica) es una modificación del método FISH para la detección de amplificación del gen HER2. Esta técnica se basa, al igual que el FISH, en la capacidad de una sonda de ácido nucleico previamente marcada de unirse *in situ* a la secuencia complementaria de ADN dentro de los núcleos celulares de una muestra tisular. Al igual que el FISH el CISH puede realizarse sobre secciones de 4 – 5  $\mu\text{m}$  de muestras fijadas en formol e incluidas en parafina; siguiendo los mismos pasos que el FISH.

La principal ventaja del CISH frente al FISH recae en la posibilidad de detectar la amplificación del gen empleando un microscopio de campo claro, no de

fluorescencia. Esto es posible mediante conversión enzimática del revelado cromogénico de las sondas fluorescentes, al unir a la sonda a hibridar un enzima peroxidasa que permite su posterior detección por métodos cromogénicos. Asimismo permite realizar de manera simultánea un control morfológico de la lesión y el recuento de las copias del gen. La señal de hibridación permanece estable por periodos prolongados a temperatura ambiente de manera similar a los estudios con inmunohistoquímica, y la lectura de los resultados es más rápida y sencilla. El mayor inconveniente de este método radica en su reciente disponibilidad comercial lo que hace que no exista una gran experiencia y que no sea una técnica validada y aprobada por las agencias reguladoras europea (EMA) ni americana (FDA).

Existen 2 clases de CISH:

- **CISH ESTÁNDAR O MONOCROMO**; en el cual se emplea una única sonda marcada para la detección del gen *HER2*, como el empleado en el preparado comercial SPoT-Light CISH detection® Kit (Zymed Immunoproducts, Invitrogen Carlsbad, CA,USA).
- **DUAL COLOUR CISH (DC-CISH) O CISH DUAL**; utiliza dos sondas simultáneamente, una marcada con dioxigenina para la detección de las copias del gen *HER2* y otra marcada con biotina para la del centrómero del cromosoma 17 (CEP17). El empleo de este dc-CISH permite el cálculo del ratio de amplificación de manera idéntica a como se realiza con el FISH así como la detección de posibles polisomías del cromosoma 17. El más reciente ejemplo de dc-CISH comercializado es el Dako Duo-CISH® (Dako, Carpinteria, California, USA), que emplea las sondas de FISH Texas Red y FITC para, posteriormente, incubarlas

primero con anticuerpos AntiTexas Red/AP y AntiFITC/HRP y finalmente con una solución de substratos cromógenos que dan la señal azul (centrómero) y roja (gen)

Para la determinación del estado del gen *HER2* en mama, cuando se emplea un método CISH monocromo como SPoT-Light CISH detection Kit® se considera que no existe amplificación del gen *HER2* cuando se detectan  $\leq 5$  copias del gen por cada núcleo en más del 50% de las células, existe amplificación baja cuando se observan entre 6 y 10 copias del gen/núcleo o pequeños agregados del gen en más del 50% de las células y amplificación alta cuando se determinan más de 10 copias del gen/núcleo o grandes agregados de copias del gen o una mezcla de ambos supuestos en más del 50% de las células. Esta lectura coincide con la recomendada por las guías del Colegio Americano de Patología (CAP) / Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) en 2007 para la interpretación del FISH utilizando únicamente sondas para la detección de *HER2*, en las cuales se recomienda un punto de corte de 6 ó más copias del gen por núcleo para considerar que existe amplificación génica.

En los casos en que se emplea un método dc-CISH la interpretación es idéntica a la realizada mediante FISH y por tanto el resultado se expresa en forma de ratio *HER2/CEP17*. En aquellos casos de cáncer de mama en los que el resultado es  $\geq 2.2$  se considera que existe amplificación (Laakso M 2006), clasificándose como amplificados aquellos carcinomas gástricos con un ratio  $\geq 2$

Desde el primer artículo en 2001 de Tanner y cols (Tanner M 2001) que demostró en muestras de cáncer de mama una excelente correlación entre los resultados de CISH y FISH (concordancia 100% en casos amplificados y 92%



en los no amplificados), se han publicado múltiples estudios sobre la correlación de resultados entre la detección de sobreexpresión de HER2 por IHQ y la amplificación del gen determinada por hibridación *in situ* cromogénica (CISH) o fluorescente (FISH). En la mayoría de los estudios la tasa de concordancia ha sido superior al 85%, demostrando una relación estrecha entre los resultados obtenidos por los 3 métodos. La mayor parte de los resultados discordantes se produjeron en muestras con baja amplificación determinada por FISH, posiblemente por diferencias en el material empleado (muestras en fresco vs parafinadas) (Tanner M 2000), discrepancias entre los 2 test (van de Vijver MJ 2003, Hanna WM 2006, Gong Y 2005) y diferentes criterios de cuantificación de las señales de hibridación en cada estudio (Bilous M 2003), así como las diferencias esperables entre los resultados de amplificación utilizando métodos con y sin control centromérico.

Con el empleo en estudios más recientes de dc-CISH, la concordancia con FISH es del 95% - 100% a la hora de determinar si existe o no amplificación y los casos discordantes se reducen al 1%-3% de tumores que son considerados con amplificación baja por FISH, es decir con ratios entre 2,0 y 2,2. Estos mismos resultados han sido obtenidos por diversos autores (Garcia Caballero 2010, Gupta D 2003, Isola J 2004, Kim GY 2004, Lacroix-Triki M 2007, Laasko M 2006).

## SISH (Hibridación *in situ* argéntica)

El método Silver – enhanced *In situ* Hibridization (SISH) o hibridación *in situ* argéntica es una técnica mixta que surge de la aplicación de los métodos metalográficos a las técnicas de hibridación *in situ* empleadas habitualmente para la determinación del status del oncogén *HER2*.

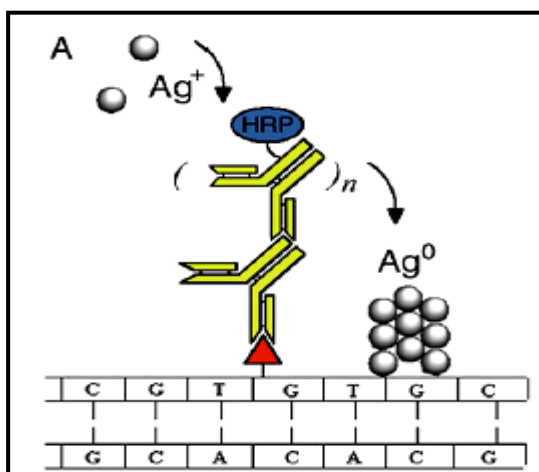
Desde principios de la década de 1970, se demostró cómo el marcaje con oro coloidal (es decir la unión de anticuerpos u otras proteínas a nanopartículas de oro de 1 a 30nm de diámetro) podía utilizarse para la señalización de dianas de interés y su posterior reconocimiento mediante microscopía electrónica. Posteriormente se aplicó como un método para la detección de cromosomas, genes y microsatélites en microscopía electrónica con hibridación *in situ*. Las nanopartículas de oro catalizan el depósito altamente selectivo de plata a partir de mezclas de sales de plata y agentes reductores, produciendo una tinción específica, de alta resolución y ópticamente visible (Faulk WP 1971, Handley DA 1989, Wu M 1981, Hutchinson NJ 1982, Ferguson DJ 1986). Este proceso fue denominado autometalografía o tinción mejorada con plata (silver – enhancement) y ha permitido el desarrollo posterior de la hibridación *in situ* argéntica (Danscher G 1983). Se obtuvo una posterior mejora de los resultados al sustituir el Oro coloidal por Nanogold, partículas de 1.4 nm que pueden ser unidas covalentemente a una gran variedad de moléculas incluyendo anticuerpos, proteínas, péptidos, oligonucleótidos y lípidos (Hainfeld JF 2000). Asimismo mejora la capacidad de penetración en las muestras de 10nm del oro coloidal hasta los 40  $\mu$ m cuando se emplea conjugado con Anticuerpos, permitiendo visualizar, cuando se utiliza en autometalografía mejorada con

plata, cantidades de Inmunoglobulina G de 0.1 pg. Cuando se han empleado para la detección mediante hibridación *in situ*, las sondas marcadas con Nanogold han demostrado mayor sensibilidad que las sondas enzimáticas pero la excesiva duración del proceso, la necesidad de múltiples pasos de amplificación de la señal para su correcta lectura y su elevado coste lo han hecho demasiado complejo para su uso rutinario en la práctica clínica. El primer intento de mejorar los resultados se produjo al sustituir la plata por oro como sustancia que es depositada para la detección de la sonda (Hainfeld JF 2002). Un método simplificado de esta técnica denominado GOLDFISH (Gold-facilitated ISH o hibridación *in situ* facilitada por oro) fue desarrollado para detectar amplificación del oncogén *HER2* en muestras parafinadas de cáncer de mama (Tubbs R 2002). Este método GOLDFISH demostró una alta concordancia en sus resultados con los obtenidos mediante FISH, aportando además la ventaja de ser una señal negra, bien definida y opaca, que es permanente y con una mayor sensibilidad y reproducibilidad que los métodos de detección basados en el depósito enzimático de cromógenos orgánicos (Tanner M 2000). Su principal desventaja radica en ser una técnica para valoración cualitativa, detectándose los casos con *HER2* amplificado como un acúmulo de señales confluentes en el núcleo celular, mientras que en los casos sin amplificación se observan señales aisladas, pequeñas y puntiformes. Esta valoración cualitativa resulta insuficiente, al igual que en otros métodos de determinación del status del gen *HER2*, por cuanto produce falsos positivos al no diferenciar los casos con amplificación baja de los casos con polisomía del Cr17 (Ma Y 2005, Dal Lago L 2006, Vera-Roman JM 2004, Loring P 2005, Bhargava R 2005).

El desarrollo definitivo del método SISH surge del descubrimiento de la capacidad de la HRP (Horseradish peroxidasa- peroxidasa de rábano rojo) de producir un depósito selectivo del metal de una solución incluso en ausencia de un agente nucleador metálico como el Nanogold, consiguiendo un depósito del metal altamente sensible y específico sobre la secuencia diana marcada por la sonda (Powell RD 2007). De manera similar al CISH podemos diferenciar dos tipos de SISH:

- **SISH MONOCROMO.** Este método SISH fue comercializado con la denominación EnzMet Genepro® (Ventana Medical Systems, Tucson AZ. USA) (Tubbs R 2004, Tubbs RR 2005, Tubbs R 2003) y demostró excelentes resultados en la detección de la amplificación de *HER2* en cáncer de mama con una disparidad de resultados frente al FISH inferior al 3%, todos ellos polisómicos con amplificación baja por FISH y con resultado no amplificado por SISH (Downs-Kelly E 2005). La Figura 5 detalla el procedimiento de tinción empleado por el método EnzMet para el desarrollo de SISH. Al tratarse de un método de hibridación sin control centromérico el resultado se expresa en número de copias del gen *HER2*, considerándose un caso amplificado si tiene más de 6 copias del gen por cada núcleo o grandes acúmulos de depósito de plata puntiformes en más del 30% de las células.

Figura 5. SISH monocromo. Modificado de Powel RD 2007



Solución de iones de plata

Reactivo de detección secundaria con  
HRP polimerizado

Anticuerpo Primario

Plata depositada ( $Ag^0$ )Sonda marcada con DNP  $\Delta$ Oncogen *HER2*

- **DUAL COLOUR SISH O SISH DUAL (DC-SISH).** Se trata de un método de hibridación argéntica bicolor automatizado comercializado como Dual Colour SISH INFORM *HER2* DNA Probe® and INFORM Chromosome 17 Probe® (Ventana Medical Systems, Tucson AZ. USA). Este método nuevo se desarrolla mediante dos hibridaciones secuenciales, primero el gen *HER2* y a continuación el centrómero del cromosoma 17. Las sondas se incuban, en un primer paso, con anti-DNP (dinitrofenol) y posteriormente con un anticuerpo de cabra conjugado con enzimas (HRP para el gen *HER2* y fosfatasa alcalina para el centrómero) a los que se unirán las sales de plata y el cromógeno rojo para su posterior visualización (ver material y métodos). El resultado es expresado como el ratio entre las copias del gen *HER2*/CEP17, considerándose amplificación positiva ratios  $\geq 2.2$  en carcinoma de mama y  $\geq 2$  en otras neoplasias, incluido el carcinoma gástrico. El proceso se ilustra en la Fig 6

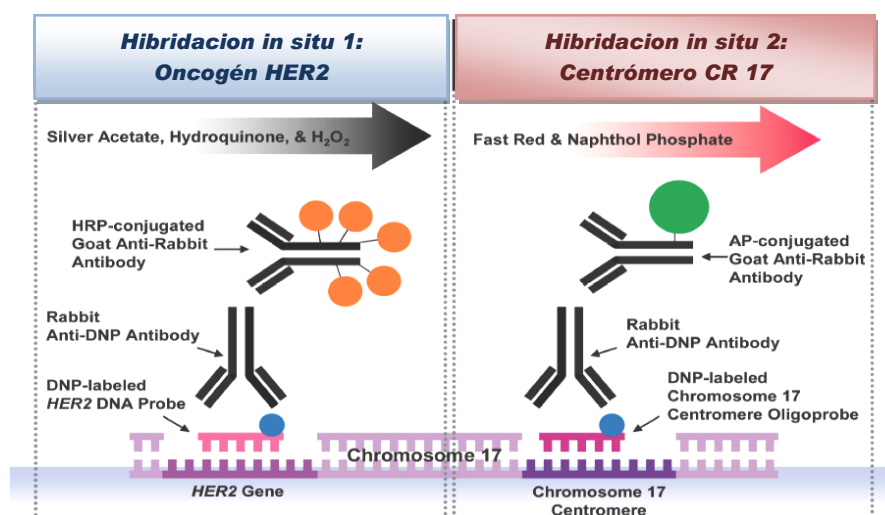


Figura 6. SISH dual. Modificado de Nita H 2008.

Este método dc-SISH es llevado a cabo de manera completamente automática mediante un sistema robotizado lo que consigue completar todo el proceso en 12 horas frente a las más de 24 horas que necesitan las técnicas de hibridación previas (FISH y CISH). Esta automatización del proceso permite el procesamiento de una mayor cantidad de muestras de modo simultáneo, aumenta la eficiencia y consistencia de los resultados y permite la realización de procesos independientes en muestras contiguas. Estas ventajas se unen a la facilidad de lectura de los resultados al precisar únicamente un microscopio de campo claro, al igual que el CISH, y permanecer, a priori, la tinción estable durante largos periodos de tiempo cuando se conserva en condiciones apropiadas. Al igual que ocurre con el CISH este método es de implantación reciente en el estudio del *HER2* y no se encuentra validado como método de referencia por las agencias reguladoras.

Los estudios de concordancia entre FISH y SISH en cáncer de mama han demostrado una concordancia del 98% en casos de tumores invasivos (Vladich F 2007) y del 94% en casos de tumores primarios de mama (Tubbs R 2007).

Otro estudio (Dietel M 2007) realizado por 5 patólogos evaluando 99 biopsias de cáncer de mama en las cuales se analizaba la expresión de HER por IHQ y su amplificación por FISH y SISH objetivó una concordancia entre FISH y SISH del 96%, con una concordancia entre observadores del 92,8%-95,2%. Estudios más recientes han confirmado asimismo, una concordancia elevada entre SISH y CISH monocromos (96%) y entre CISH monocromo y dc-SISH (95.5%) (Francis GD 2009). Por el momento no existen datos publicados de la amplificación de *HER2* en cáncer gástrico determinada por SISH monocromo o dual.

A pesar de considerarse, en la actualidad, como métodos experimentales, las técnicas de hibridación *in situ* dc-CISH y dc-SISH parecen alternativas viables, sencillas y con resultados superponibles a otras tecnologías más costosas y de difícil implementación en laboratorios de Anatomía Patológica como el FISH. (Penault-Llorca F 2009)

# OBJETIVOS



1. Establecer una plataforma multidisciplinar para el estudio de los adenocarcinomas gástricos humanos, en la que se integre información clínica, anatomopatológica y molecular que permita llevar a cabo estudios de oncología traslacional.
2. Determinar la existencia o no de una correlación apropiada entre la expresión proteica del receptor HER2 determinada por inmunohistoquímica y la amplificación del gen detectada por métodos de hibridación *in situ* (FISH o SISH).
3. Determinar la concordancia entre las distintas metodologías de hibridación *in situ* utilizadas (FISH y SISH) en el objetivo anterior.
4. Validar, en una serie de adenocarcinomas gástricos, el empleo de una nueva técnica de hibridación *in situ* (SISH o hibridación *in situ* argéntica) para el estudio de la amplificación de *HER2* en este contexto.
5. Determinar si la sobreexpresión proteica o la amplificación del gen *HER2* se asocian de manera significativa con otros rasgos clínico-patológicos en pacientes con adenocarcinoma gástrico.

6. Determinar si la sobreexpresión proteica o la amplificación del gen *HER2* poseen un carácter pronóstico en los adenocarcinomas gástricos.
7. Determinar si la sobreexpresión proteica o la amplificación del gen *HER2* poseen un carácter predictivo de la respuesta al tratamiento con agentes dirigidos frente al receptor HER2 en adenocarcinomas gástricos.

# MATERIAL Y MÉTODOS

## SELECCIÓN DE CASOS

Los adenocarcinomas gástricos (ACG) estudiados en esta tesis proceden de varios centros hospitalarios de España.

Todas las muestras corresponden a pacientes diagnosticados de ACG y atendidos en los Servicios de Oncología Médica entre los años 2003 y 2009. Se incluyeron aquellos casos en los que se disponía, al menos inicialmente, del material histopatológico suficiente para su estudio y de los datos clínicos necesarios y pertinentes para su posterior correlación.

Dada la necesidad de recoger datos confidenciales de los pacientes incluidos, este proyecto fue presentado con el código interno 08/246 para su aprobación por el Comité Ético y de Investigación Clínica del Hospital Universitario “12 de Octubre” de Madrid, valorándose positivamente y autorizando su realización según dictamen del mismo con fecha 25 de Noviembre de 2008. Los datos clínicos e histológicos recogidos fueron anonimizados.

## RECOGIDA DE DATOS CLINICOS

La recogida de datos clínicos fue llevada a cabo de forma centralizada mediante la revisión de las historias clínicas de todos los pacientes incluidos inicialmente en esta tesis. De los 174 pacientes de la serie inicial se obtuvieron datos de seguimiento clínico y supervivencia en 172 casos. De estos 172 casos, 148 corresponden a pacientes con cáncer gástrico metastático y 24 a pacientes intervenidos y sin evidencia de recidiva ni diseminación metastásica en el momento de su inclusión en nuestra serie. Los datos clínico-patológicos obtenidos de cada paciente fueron:

- Epidemiológicos: edad, sexo.
- Anatomopatológicos: tipo histológico, grado de diferenciación, estadificación TNM patológica.
- Clínicos: afectación metastásica y localización de la misma, antecedentes de cirugía del cáncer gástrico y fecha de la misma, tratamiento adyuvante y tipo, fecha de recidiva y tratamiento de 1ª línea de la misma, respuesta al tratamiento de 1ª línea, fecha de recidiva tras tratamiento de 1ª línea y tratamiento de 2ª línea administrado, respuesta al tratamiento de 2ª línea, fecha de exitus o de último seguimiento y situación en el mismo.

## ESTUDIO HISTOLÓGICO

Las muestras histológicas empleadas se obtuvieron a partir de muestras endoscópicas obtenidas para el diagnóstico tumoral, de las piezas quirúrgicas procedentes de gastrectomías, y/o de muestras quirúrgicas procedentes de localizaciones metastásicas.

En aquellos casos en que se disponía de más de una muestra por paciente se seleccionó para su análisis molecular aquella en mejor estado de conservación y contenido mayor de tejido tumoral.

De cada una de las muestras se evaluaron todas las preparaciones histológicas disponibles, seleccionando con un rotulador indeleble aquellas áreas que contuviesen una cantidad óptima de tumor y excluyendo las zonas con necrosis o inflamación. Una vez elegidas las preparaciones más representativas de cada caso, se seleccionaron sus respectivos bloques. Se recogieron 174 muestras

de material fijado en formol tamponado al 10% e incluido en parafina para su posterior sección, tinción con hematoxilina-eosina y valoración con microscopía óptica. Todos los casos fueron revisados y clasificados de acuerdo a la última clasificación de la OMS (WHO 2000) y la clasificación de Laurén por dos patólogos (E. García, F. López-Ríos). De esta serie inicial, se excluyó un caso por no disponerse de material suficiente.

Inicialmente se realizaron 10 cortes de 3  $\mu$  de cada uno de los bloques para su posterior uso en las técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ*. Para ello, se empleó la técnica tradicional de microtomía: enfriando ligeramente los bloques antes de cortarlos, empleando un baño de agua caliente y utilizando portaobjetos silanizados (cargados electrostáticamente). Para mantener la antigenicidad de los cortes tisulares tras la sección, los portaobjetos se introdujeron en parafina líquida y así se almacenaron. Para su uso inmediato posterior, se eliminó la parafina dejando los portaobjetos en la estufa toda la noche a 56° C.

En 30 casos, sólo se dispuso de 10 secciones de tejido para todos los estudios.

## ESTUDIO DE INMUNOHISTOQUIMICA PARA LA DETERMINACION DE HER2.

El estudio para la determinación de la proteína HER2 mediante inmunohistoquímica se realizó con el anticuerpo Pathway anti-HER-2/*neu* (4B5) en la plataforma automatizada BenchMark ULTRA® (Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ). Como control positivo se seleccionó un carcinoma de mama con expresión proteica 3+ para HER2 y como control negativo un carcinoma de mama con expresión proteica 0 para HER2. El desparafinado y recuperación antigénica con CC1 durante 30 minutos se realizaron de manera automatizada en el BenchMark ULTRA. A continuación, el anticuerpo anti-HER-2/*neu* (4B5) fue incubado durante 16 minutos a 37° C. La detección antigénica se realizó con *ultraview* Universal DAB Detection Kit. Las muestras fueron contrateñidas con Hematoxilina II durante 8 minutos y “Bluing Reagent” durante 4 minutos.

## ESTUDIO DE FISH PARA LA DETERMINACIÓN DE *HER2*

El análisis del número de copias del gen *HER2* fue estudiado mediante técnica de FISH se realizó con la sonda comercial PathVysion HER2 DNA probe kit® (Vysis Inc, Abbot Laboratories, IL). El protocolo recomendado por el fabricante fue modificado, empleándose el DAKO Histology FISH Accesory kit® con el fin de optimizar la técnica (reducción en los procedimientos de laboratorio) (Tubbs RR 2007). La técnica se realizó sobre secciones completas de adenocarcinomas gástricos. Como controles positivos y negativos, se incluyeron secciones de carcinoma de mama amplificado y no amplificado para *HER2* respectivamente. Las secciones se mantuvieron en la estufa a 56° C

durante toda la noche y posteriormente fueron desparafinadas en dos series de xilol y rehidratadas en una serie de alcoholes de graduación decreciente. Los cristales fueron pretratados con “Pretreatment Solution” (solución de pretratamiento) en baño a 97° C durante 10 minutos. La digestión enzimática se realizó con pepsina “Ready-to-Use” durante 3 minutos a temperatura ambiente para las biopsias endoscópicas y durante 6 minutos a 37° C para las piezas quirúrgicas. Las secciones se deshidrataron con alcoholes de graduación ascendente. A continuación, se aplicaron 10 µl de mezcla de sonda HER2/CEP17 en cada sección de tejido. Las condiciones de hibridación fueron: desnaturalización de la sonda y el tejido a 80° C durante 5 minutos e hibridación durante toda la noche en un hibridador a 37° C. El segundo día de la técnica, las secciones fueron lavadas con “Stringent Wash Buffer” (buffer de astringencia) a 65° C durante 10 minutos en un baño. Por último, las muestras fueron deshidratadas usando una serie de alcoholes. Se contratiñeron los núcleos con DAPI (4', 6-Diamino-2-phenylindole, dihydrochloride), 10 µl por porta.

#### ESTUDIO DE CISH DUAL PARA LA DETERMINACION DE *HER2*

La técnica de CISH se realizó de acuerdo al protocolo del fabricante. La primera parte de la técnica consistió en una hibridación *in situ* fluorescente usando la sonda HER2 FISH pharmDx kit® (Dako). Los pasos de la técnica fueron los mismos que los descritos en la técnica de FISH excepto las condiciones de hibridación. Las secciones fueron desnaturalizadas a 82° C durante 5 minutos e hibridadas a 45° C durante toda la noche. Los últimos pasos de la técnica de FISH (deshidratación y contratinción con DAPI) fueron



omitidos para realizar el revelado cromogénico con el kit Dako DuoCISH®. Los cristales fueron introducidos en el Autostainer y se realizó el protocolo de tinción automatizado. Este protocolo consiste en un primer paso de bloqueo endógeno de la peroxidasa con “Ready-to-use Peroxidase Block” seguido de la incubación de una mezcla de anticuerpo que contiene anti-FITC conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) y anti-Texas Red conjugado con fosfatasa alcalina. A continuación, las muestras tisulares son incubadas con una solución de cromógeno rojo (Red Chromogen solution) durante 10 minutos, seguida de otra incubación con cromógeno azul (Blue Chromogen solution) durante 10 minutos. La conversión enzimática de los cromógenos da como resultado señales rojas y azules unidas a los antígenos correspondientes. De este modo, las señales rojas fluorescentes correspondientes a la sonda Texas Red se convierten en señales cromogénicas rojas y las señales verdes fluorescentes (FITC) se transforman en señales cromogénicas azules. A continuación, los cristales se secan al aire y se montan con medio de montaje permanente.

#### ESTUDIO DE SISH PARA LA DETERMINACIÓN DE *HER2*.

La técnica de hibridación *in situ* argéntica (SISH) fue realizada de forma automatizada en Ventana Benchmark XT® (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Las sondas para el gen *HER2* (INFORM HER2 DNA Probe®) y para el centrómero del cromosoma 17 (INFORM Chromosome 17 Probe®) fueron visualizadas en la misma preparación siguiendo el protocolo del fabricante e introduciendo variaciones mínimas a las condiciones de la técnica con el fin de conseguir resultados óptimos. La totalidad del procedimiento (desparafinado, pretratamiento, hibridación, astringencia, revelado de la señal y contratinción)

se realizó de forma totalmente automatizada (Nitta H 2008). El pretratamiento se realizó con “Reaction Buffer” y digestión enzimática con ISH Protease 3 durante 12 minutos. La sonda para el gen *HER2* fue desnaturalizada a 95° C durante 15 minutos e hibridada a 56° C durante 6 horas. En un segundo paso, la sonda para el centrómero del cromosoma 17 fue desnaturalizada a 95° C durante 12 minutos, realizándose la hibridación a 44° C durante 3 horas. Los lavados de astringencia para la sonda del gen se realizaron a 72° C durante 8 minutos (3 pasos) y, posteriormente, los cristales fueron incubados con el anticuerpo anti-DNP (dinitrophenol) durante 20 minutos. A continuación, las muestras fueron incubadas con anticuerpo de cabra conjugado con HRP durante 16 minutos. La señal de plata para *HER2* fue revelada mediante reacciones secuenciales con plata (Silver C) durante 4 minutos. Para la sonda del centrómero del cromosoma 17, se realizaron tres lavados de astringencia a 59° C durante 8 minutos. Posteriormente, las secciones fueron incubadas con anticuerpo anti-DNP durante 20 minutos y anticuerpo de cabra conjugado con fosfatasa alcalina durante 12 minutos. La señal del centrómero se reveló con Red ISH Naphthol durante 4 minutos. Las muestras fueron contrateñidas con Hematoxilina II durante 8 y con “Bluing Reagent” durante 4 minutos. Los cristales fueron montados con el medio permanente Cytoseal.

## FASE POST-ANALÍTICA (INTERPRETACIÓN)

### INMUNOHISTOQUÍMICA

Todas las secciones fueron evaluadas por tres observadores (C. Gómez, E. García y F. López-Ríos) de forma independiente. Uno de los observadores empleó el sistema de evaluación de HER2 en carcinoma de mama (Wolff AC 2007), un segundo observador valoró siguiendo los criterios de Hofmann (Hofmann M 2008) para carcinoma gástrico y un tercer observador utilizó un sistema cuantitativo de lectura (Targos Molecular Pathology GmbH, Kassel, Germany, datos no publicados). Se seleccionaron las áreas con expresión mayor de la proteína para su valoración. En los casos discordantes se realizó un acuerdo interobservadores para el análisis estadístico final.

### HIBRIDACIÓN

Todas las muestras fueron evaluadas por tres observadores (C. Gómez, E. García y F. López-Ríos) de forma independiente. Previamente, toda la preparación se examinó con los objetivos de 10x y 40x en las técnicas de SISH y CISH y el objetivo de 100x en la técnica de FISH, con el fin de identificar las áreas para el conteo y evitar errores debidos a la heterogeneidad tumoral.

Para el FISH, se evaluaron un total de 20 núcleos en dos áreas diferentes usando un microscopio de fluorescencia (Olympus BX61) equipado con los filtros DAPI, Spectrum Orange, Spectrum Green y un filtro doble Orange/Green, usando una lente de inmersión (100x).

La evaluación de SISH y CISH se realizó usando un microscopio de campo claro (Olympus BX41) con el objetivo de 40x. Un caso se consideró amplificado

para HER2 cuando el ratio fue  $\geq 2$ , no amplificado cuando el ratio fue  $< 2$ . La polisomía del cromosoma 17 se definió como  $\geq 3$  copias del centrómero del cromosoma 17 por núcleo (Hofmann M 2008). Los patrones de amplificación en “clusters” *versus* “double minutes” fueron considerados siguiendo los criterios publicados (Kanta SY 2006).

## ALMACENAMIENTO DE LOS DATOS Y ESTUDIO ESTADÍSTICO

Los datos recogidos de las variables clínicas y anatomopatológicas se incluyeron en una base de datos Access (MS Access, Microsoft Office 2007, Microcomputer Software, Redmon, Washington, USA).

El análisis estadístico se realizó utilizando la aplicación informática SPSS versión 12.0 (SPSS INC, Chicago, IL, USA). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellas con una  $p < 0.05$ . El estudio estadístico constó de los siguientes procedimientos:

### ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA.

En primer lugar, se efectuó un análisis descriptivo de las diferentes variables cualitativas y cuantitativas objeto del estudio.

- Análisis de frecuencia o porcentajes de las variables cualitativas.
- Determinación de media  $\pm$  desviación estándar, mediana y rango de las variables cuantitativas

### ESTADÍSTICA INFERENCIAL.

Este análisis tiene como finalidad establecer conclusiones respecto a las muestras y variables estudiadas.

Para todos los análisis realizados se estableció un riesgo bilateral, o nivel de significación  $\alpha=0.05$ . En el caso de las variables cuantitativas objeto de estudio, la comprobación de la hipótesis de normalidad se realizó mediante el test estadístico de Kolmogorov-Smirnov.

La comparación de grupos independientes, respecto a las variables cuantitativas, se realizó mediante la aplicación del test t de Student (comparación de dos grupos), o Anova (comparación de más de dos grupos) cuando la variable sigue una distribución normal. En aquellos casos en que la variable no sigue una distribución normal, se aplicó el test no paramétrico Wicoxon-Mann-Whitney (para la comparación de dos grupos) o el test no paramétrico Kruskal-Wallis (comparación de más de dos grupos) .

En las variables categóricas, la posible asociación entre el resultado de la técnica empleada (IHQ, FISH, SISH) y los distintos parámetros clínico-patológicos se analizó mediante el test Chi-cuadrado o, cuando se requería, mediante el test exacto de Fischer. También se aplicó el test Cochran-Mantel-Haenszel en aquellos casos en que la variable categórica tenía un carácter ordinal.

La supervivencia global se midió desde el momento del diagnóstico de enfermedad metastásica hasta la muerte del paciente por cualquier causa. Un paciente no fallecido se considera censurado, en la última fecha de contacto.

El análisis de la supervivencia global y del tiempo hasta la progresión tumoral se realizó aplicando en primer lugar un modelo de Kaplan-Meier, estimando la mediana y el IC al 95%. Las diferencias en las curvas de supervivencia fueron

comparadas mediante el test de Log-Rank y, en los análisis en los que se consideró necesario, mediante los test de Breslow y Tarone-Ware.

Se aplicó también un modelo de regresión de Cox, para identificar qué variables podrías tener valor pronóstico de la supervivencia y analizar el mismo.

Se realizó un análisis de la consistencia interna de las medidas de expresión de HER2 calculando el coeficiente Alpha de Cronbach,

Por último se realizó un análisis de correlación para estudiar la relación entre las variables analizadas, aplicando el coeficiente de correlación de Pearson que mide la fuerza de la asociación lineal entre dos variables cuantitativas ( $p = \pm 1$ , relación perfecta entre las variables,  $p = 0$  no hay relación lineal). Se consideró que existía correlación significativa para valores de  $p < 0,05$ . Asimismo se determinó el coeficiente de correlación intraclass para estimar la fiabilidad de las medidas.

# RESULTADOS

## RESULTADOS DE LA DETERMINACION DEL ESTADO HER2 POR INMUNOHISTOQUIMICA (IHQ)

El análisis inmunohistoquímico (IHQ) de la sobreexpresión del receptor HER2 pudo realizarse en 173 de los 174 casos incluidos inicialmente en el estudio, es decir, en un 99,45% de los casos.

Se catalogaron como IHQ 0: 139 casos, IHQ 1+: 5 casos, IHQ 2+: 6 casos e IHQ 3+: 17 casos.

De los 17 casos con resultado 3+, 1 caso (5,8%) fue diagnosticado como adenocarcinoma difuso en la clasificación de Laurén, 2 (11,76%) como tipo indeterminado y los 14 restantes (82,35%) eran de tipo intestinal de acuerdo con dicha clasificación.

Si consideramos como casos positivos aquellos con resultado de IHQ 3+, la tasa de sobreexpresión de HER2 en nuestra serie de cáncer gástrico medida por IHQ es del 9,8%.

Las figuras 7, 8, 9 y 10 muestran ejemplos de resultados IHQ 0, 1, 2, 3+ en nuestra serie.



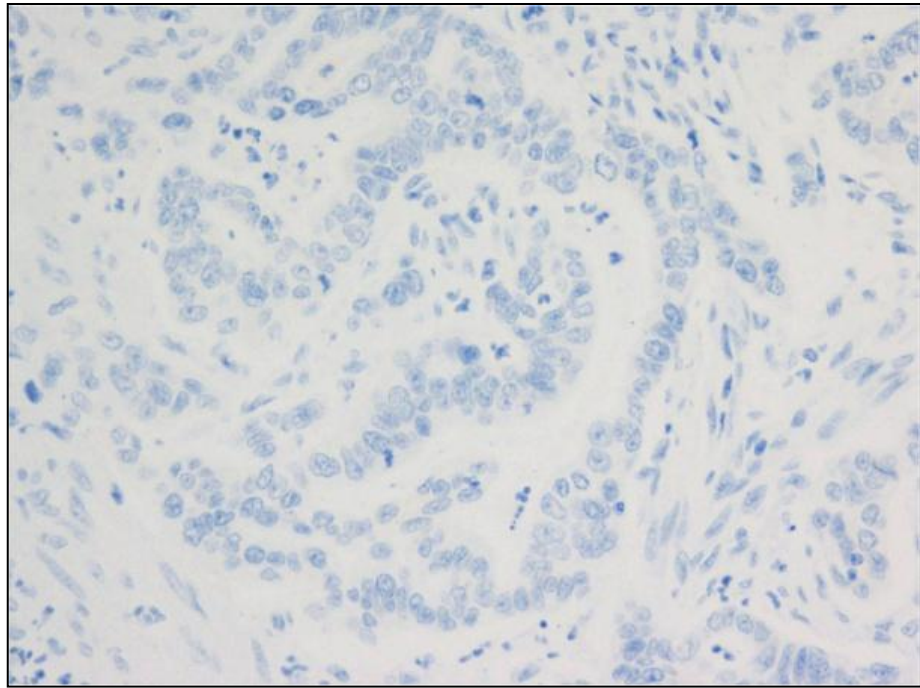


Figura 7. IHQ HER2 0 #17. 40x

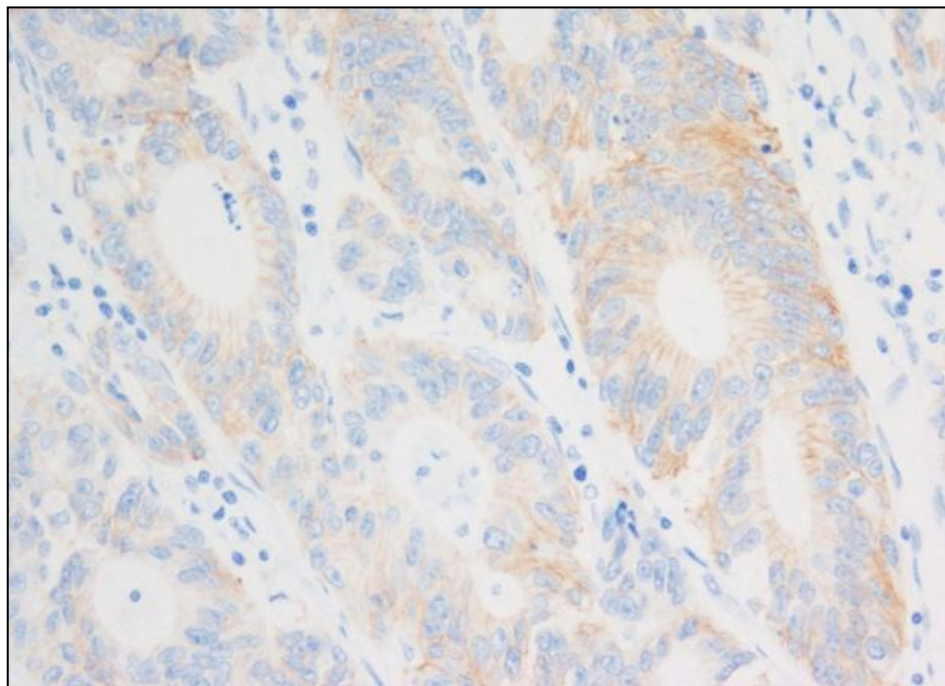


Figura 8. IHQ HER2 1+ #111. 40x

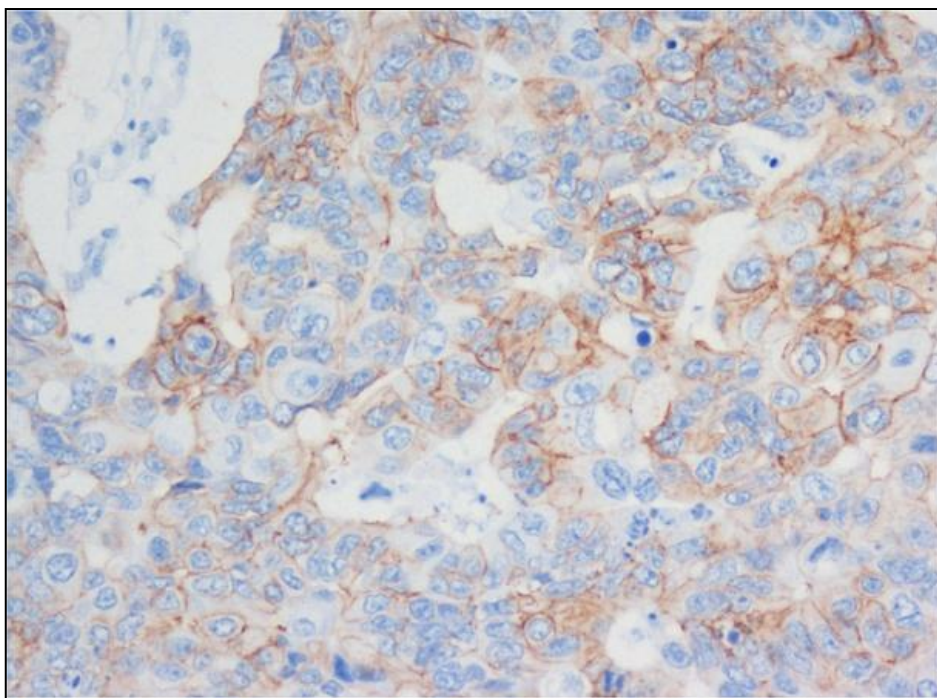


Figura 9. IHQ HER2 2+ #63 . 40x

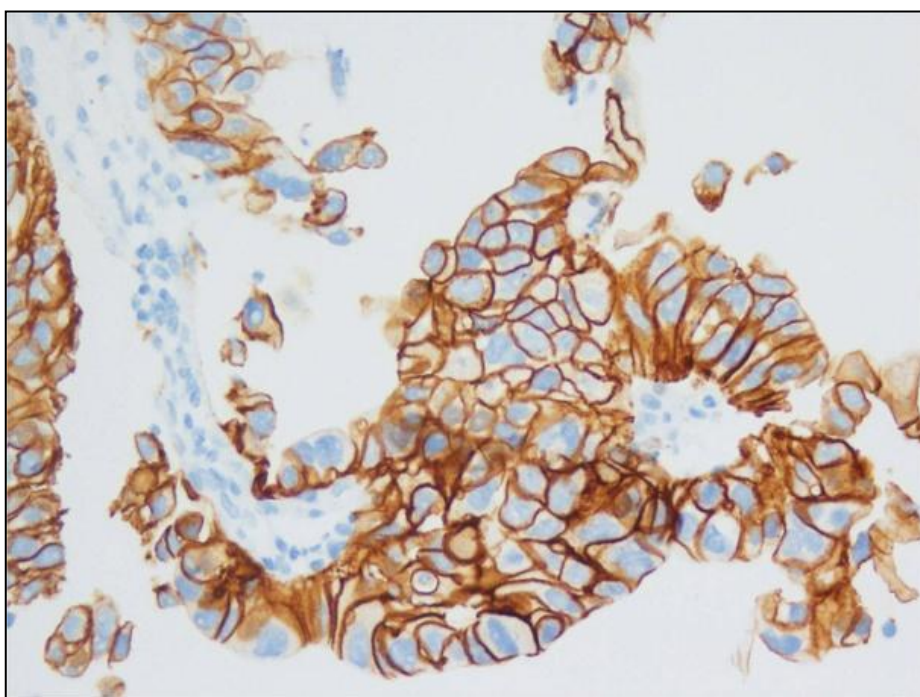


Figura 10. IHQ HER2 3+. #170. 40x

## RESULTADOS DE LA DETERMINACION DEL ESTADO HER2 POR FISH

De los 174 casos incluidos en el estudio se pudo determinar correctamente el estado del oncogén *HER2* por FISH en 170. Los cuatro casos fallidos se debieron a ausencia de material neoplásico en la muestra remitida para su estudio (2 casos:133 y 169) y ausencia de muestra disponible para realización de FISH (2 casos:47 y 37). Esto corresponde a un 97,70% de muestras procesadas con resultado evaluable por FISH.

Considerando amplificados aquellos casos cuyo ratio *HER2*/CEP17 es  $\geq 2$ , la tasa de cáncer gástrico amplificado en nuestra serie es del 17,64% (30 de 170 casos). De estos 30 casos amplificados, 26 (86,66%) corresponden a adenocarcinomas gástricos de tipo intestinal, 3 (10%) a casos catalogados como indeterminados y sólo1 caso (3,3%) fue un adenocarcinoma de tipo difuso.

La figura 11 muestra un caso sin amplificación por FISH, la figura 12 un ejemplo de caso con polisomía del Cr 17 y las figuras 13 y 14 dos ejemplos de amplificación: una en forma de “clusters” y en otra en “double minutes”. Todos los ejemplos están tomados de nuestra serie.

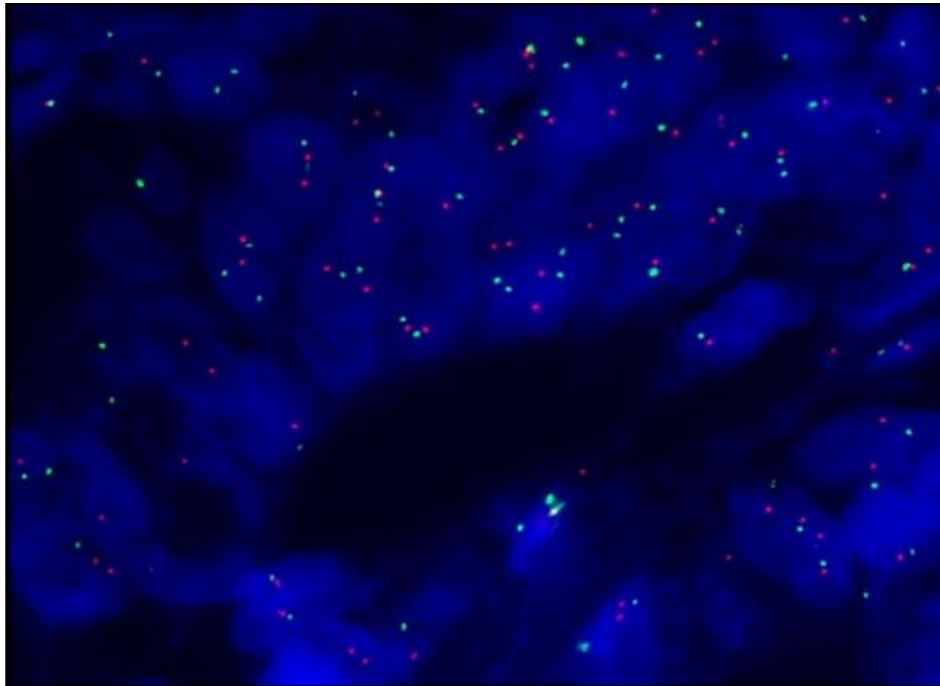


Figura 11. FISH *HER2*/CEP17 No amplificado. #157. 100x

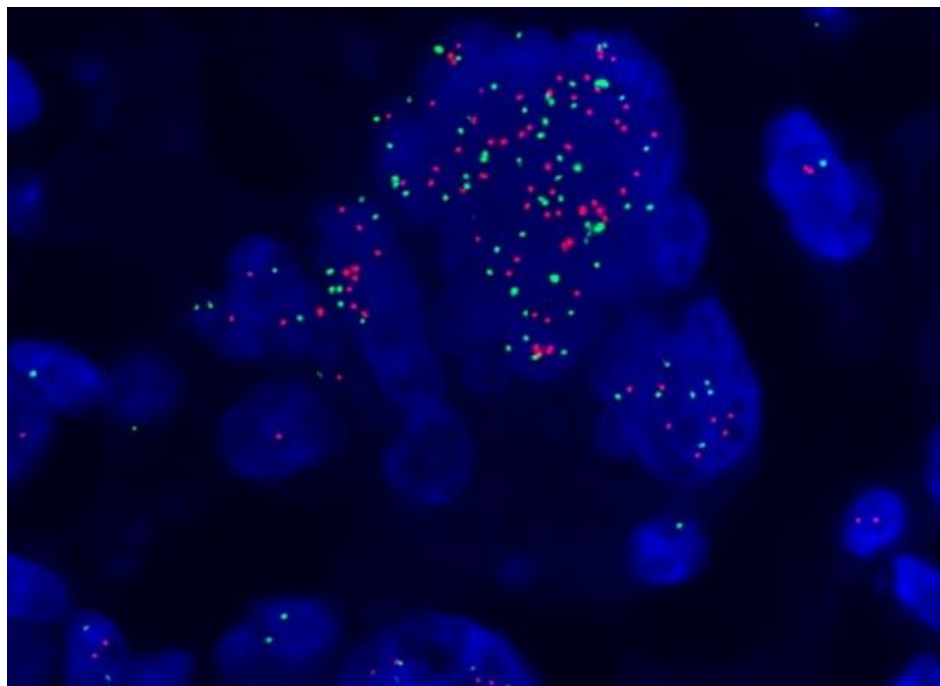


Figura 12. FISH *HER2*/CEP17. No Amplificado Polisomia Cr 17. # 67. 100x



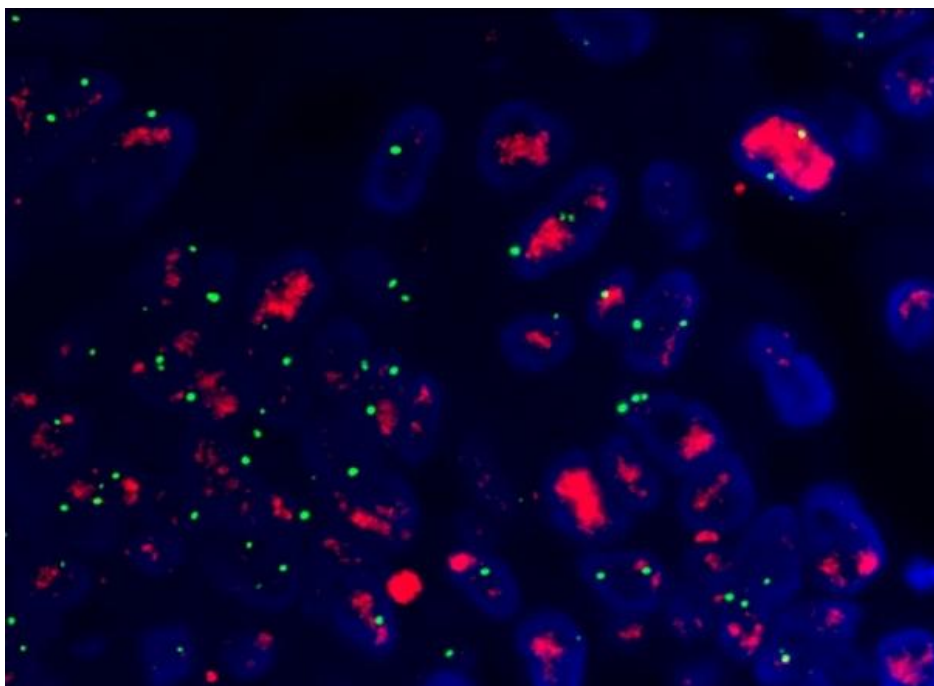


Figura 13. FISH *HER2*/CEP17. Amplificado. Clusters. #131. 100x

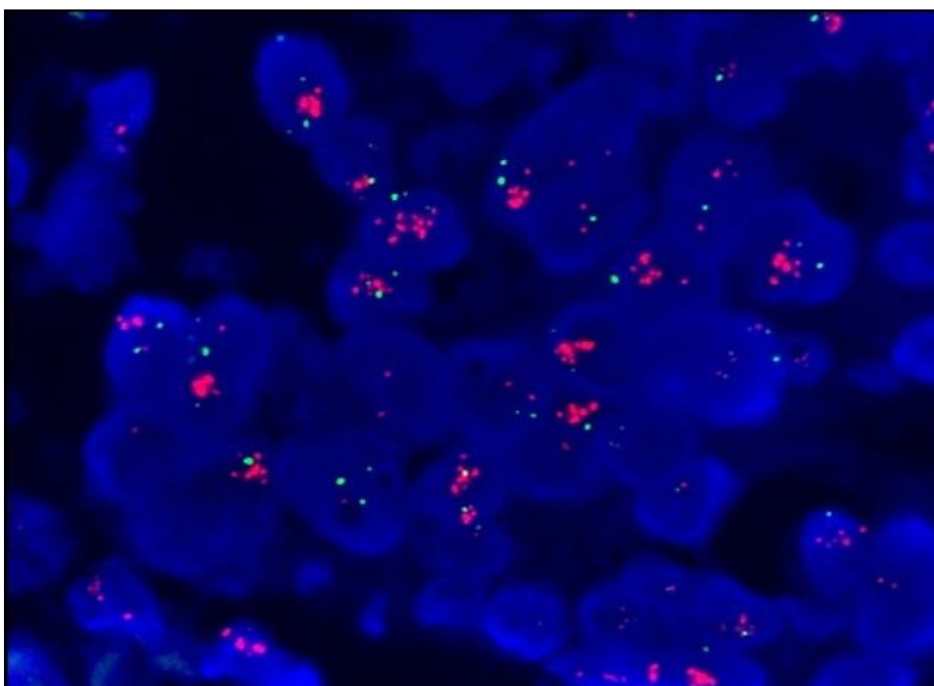


Figura 14. FISH *HER2*/CEP17. Amplificado. D Minutes.# 48. 100x

## RESULTADOS DE LA DETERMINACION DEL ESTADO *HER2* POR SISH

Se pudo obtener un resultado evaluable en 169 muestras de entre los 174 casos del estudio, es decir en un 97,10% de los casos. Las cinco muestras no evaluables corresponden a 3 casos en los cuales la muestra analizada no contenía material tumoral suficiente para su análisis por SISH y 2 casos en los cuales no se recibió bloque de parafina.

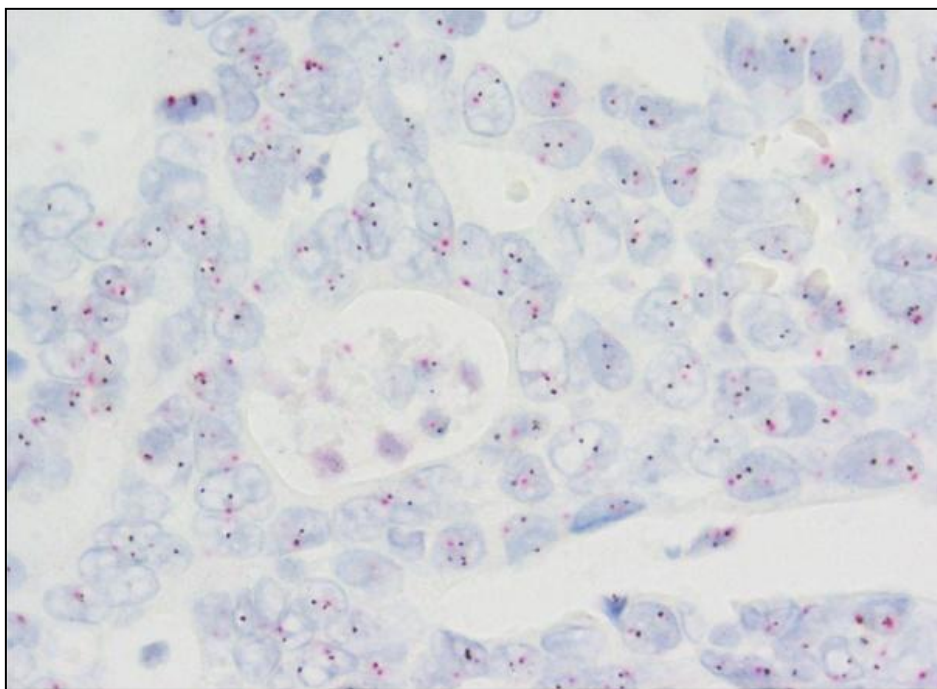
La concordancia entre los dos observadores experimentados (F. López-Ríos y E. García) fue del 100%, por lo que el estudio estadístico se simplificó a dos observadores (C. Gómez-evaluador 1 vs FLR y EG-evaluador 2). Para SISH, se realizó un segundo estudio estadístico considerando como un caso amplificado para *HER2* cuando el ratio era  $\geq 3$ .

Las figuras 15, 16 y 17 muestran 3 ejemplos: un caso sin amplificación del oncogén *HER2*, un caso con amplificación en “Clusters” y otro caso con amplificación en double minutes.

Empleando el ratio  $\geq 2$  como punto de corte el evaluador 1 encontró amplificación en un 20,11% de los casos (34 de 169), disminuyendo al 14,79% (25 amplificados de 169 casos) si se emplea el ratio  $\geq 3$  como punto de corte para considerar

Los resultados fueron similares para el evaluador 2: 34 casos amplificados de 169 totales empleando ratio  $\geq 2$  como punto de corte (20,11%) y 27 casos amplificados (15,97%) empleando el ratio  $\geq 3$ .

De los 34 casos amplificados por SISH ratio  $\geq 2$ , 28 correspondieron a adenocarcinomas de tipo intestinal (82,35%), 4 a carcinomas indeterminados (11,76%) y 2 fueron considerados adenocarcinomas de tipo difuso (5,86%).



**Figura 15. SISH *HER2*/CEP17. No Amplificado #17. 40x**

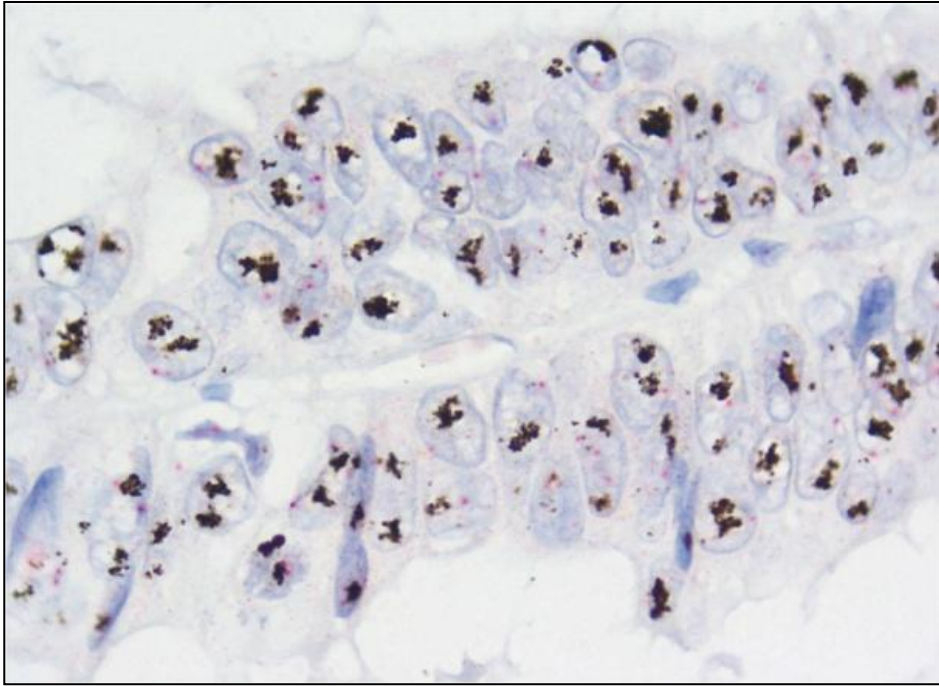


Figura 16. SISH *HER2*/CEP17. Amplificado. Clusters #171. 100x

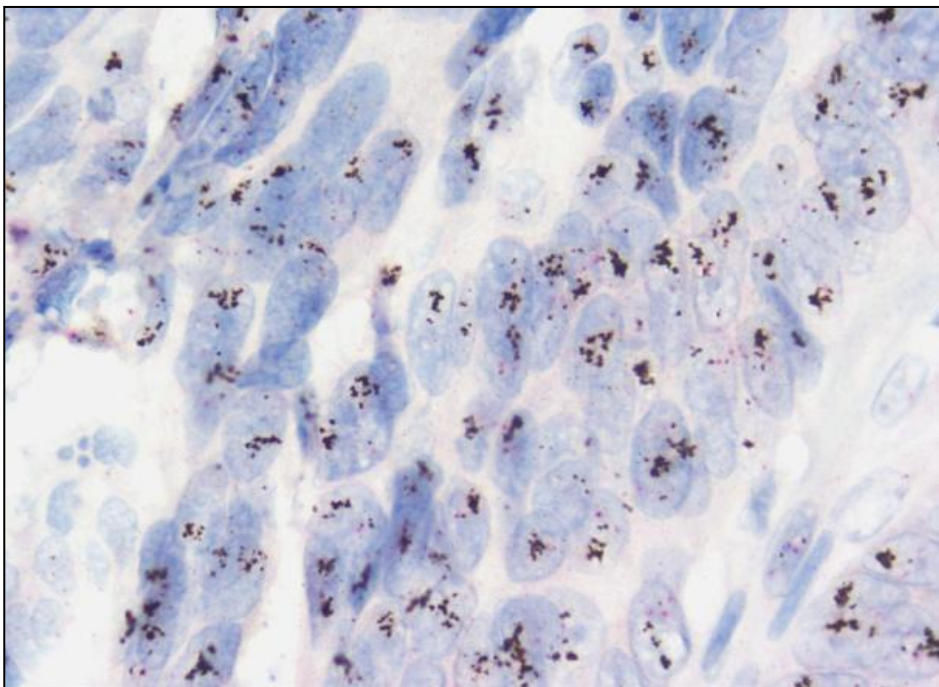


Figura 17. SISH *HER2*/CEP17. Amplificado. D. Minutes. #119. 40x



En 6 de los 34 casos amplificados según el método SISH hubo discordancia con el resultado del FISH, que no mostraba amplificación (casos 8, 39, 67, 68, 113 y 129). En todos estos casos el ratio de amplificación por SISH resultó bajo, entre 2,0 y 3,0, realizándose posteriormente RT-PCR para la comprobación del número de copias del gen

En los 6 casos se descartó amplificación del gen por RT-PCR y se evidenció por FISH la existencia de polisomía del cromosoma 17, como se muestra en la Tabla 10 y en las imágenes 18 y 19 en las cuales se aprecia uno de los casos discordantes con aparente amplificación por SISH y polisomía por FISH.

#	FISH	SISH	PCR cuantitativa en Tiempo real.		
			Ratio HER2/RPL23	Ratio Normalizado	Status
8	No Amplificado	Amplificado	0.8503	0.9171	No Amplificado
39	No Amplificado	Amplificado	0.8597	0.9271	No Amplificado
67	No Amplificado	Amplificado	0.8880	0.9577	No Amplificado
68	No Amplificado	Amplificado	0.3276	0.3533	No Amplificado
113	No Amplificado	Amplificado	0.7460	0.8045	No Amplificado
129	No Amplificado	Amplificado	0.5388	0.5811	No Amplificado

**Tabla 10. Resultados correlación FISH - SISH - RT PCR en los casos discordantes.**

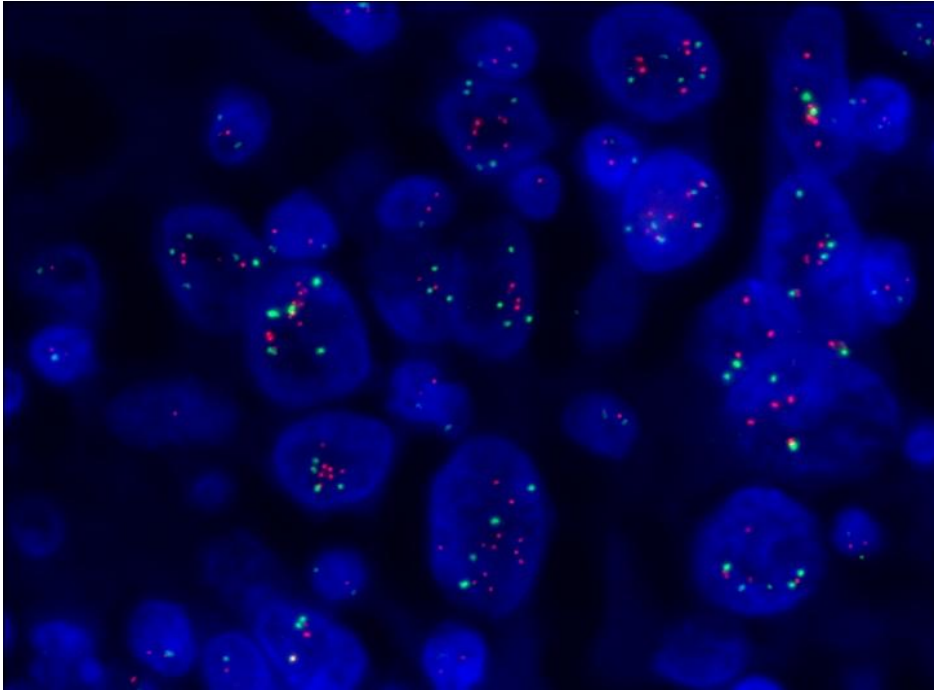


Figura 4. Polisomia Cr 17 FISH *HER2*/CEP17 No Amplificado. # 67. 100x

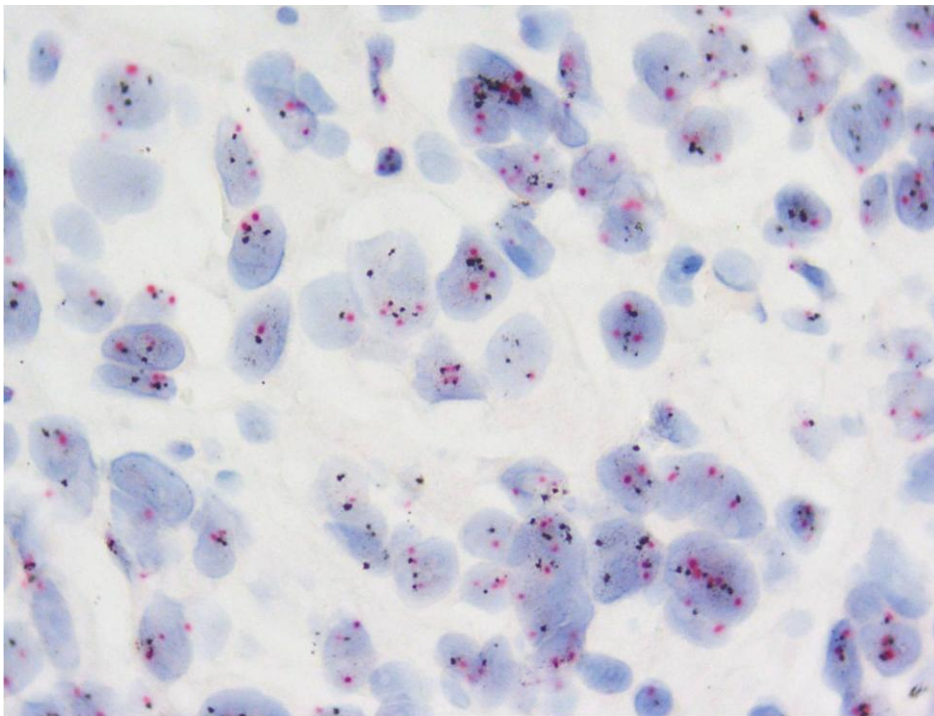


Figura 19. SISH *HER2*/CEP17. Amplificado # 67. 100x.

## RESULTADOS DE LA DETERMINACION DEL ESTADO DE *HER2* POR DC-CISH

Como estudio piloto se llevó a cabo la determinación del estado del oncogén *HER2* mediante dc-CISH en 29 muestras seleccionadas entre los casos incluidos en este estudio. Al tratarse de un estudio inicial y complementario se escogieron las muestras de manera aleatoria entre los casos amplificados y no amplificados por separado, cumpliendo el requisito previo de mantener una relación aproximada 2:1 entre los no amplificados y los amplificados respectivamente.

Los resultados detallados del análisis de estos 29 casos se detallan en la tabla 11.

La concordancia de resultados entre dc-CISH y FISH fue del 100% de los casos.

De modo similar, los resultados obtenidos por el método dc-CISH tuvieron una concordancia del 93,10% con los revelados por SISH. En 2 casos el resultado fue distinto según la técnica empleada; en uno de ellos el CISH no mostró amplificación del *HER2* que si resultó amplificado cuando se empleó el SISH (ratio 3,8) (caso nº 34), y en otro caso la muestra no fue valorable por SISH, siendo no amplificada por dc-CISH (caso nº 133).

CASO #	FISH HER2	Ratio FISH	CISH HER2	Ratio CISH1	Ratio CISH2	SISH HER2	RATIO SISH1	RATIO SISH2
5	No amplificado	< 2	No amplificado	0,97	0,97	No amplificado	< 2	< 2
10	No amplificado	< 2	No amplificado	1,15	1,15	No amplificado	< 2	< 2
17	No amplificado	< 2	No amplificado	1,1	0,86	No amplificado	< 2	< 2
22	No amplificado	< 2	No amplificado	1,06	1,09	No amplificado	< 2	< 2
23	No amplificado	< 2	No amplificado	< 2	0,9	No amplificado	< 2	< 2
24	No amplificado	< 2	No amplificado	1,4	0,97	No amplificado	< 2	< 2
32	No amplificado	< 2	No amplificado	1,01	1,05	No amplificado	< 2	< 2
34	AMPLIFICADO	2,08	AMPLIFICADO	2,6	2,7	AMPLIFICADO	3,8	5,1
38	AMPLIFICADO	5,05	AMPLIFICADO	4,27	4,13	AMPLIFICADO	9,3	6,3
41	AMPLIFICADO	6,97	AMPLIFICADO	5,4	5,23	AMPLIFICADO	6	3,78
46	No amplificado	< 2	No amplificado	1,1	0,8	No amplificado	< 2	< 2
48	AMPLIFICADO	3,67	AMPLIFICADO	5,6	5,69	AMPLIFICADO	4,7	3,6
53	no amplified	< 2	No amplificado	1,26	1,3	No amplificado	< 2	< 2
57	AMPLIFICADO	4,2	AMPLIFICADO	5,02	5,8	AMPLIFICADO	5,12	8,9
63	AMPLIFICADO	3,1	AMPLIFICADO	5,5	6,74	AMPLIFICADO	5,4	5,45
70	No amplificado	< 2	No amplificado	1,26	1,24	No amplificado	< 2	< 2
71	AMPLIFICADO	2,39	AMPLIFICADO	4,47	4,58	AMPLIFICADO	2,7	3,2
74	No amplificado	< 2	no amplified	1,19	1,02	No amplificado	< 2	< 2
85	AMPLIFICADO	10,8	AMPLIFICADO	11,05	11,21	AMPLIFICADO	10,26	10
91	AMPLIFICADO	9,9	AMPLIFICADO	9,2	9,5	AMPLIFICADO	7,5	8,8
115	No amplificado	< 2	No amplificado	< 2	< 2	No amplificado	< 2	< 2
116	No amplificado	< 2	No amplificado	1,21	1,21	No amplificado	< 2	< 2
119	AMPLIFICADO	4,9	AMPLIFICADO	16,9	17,4	AMPLIFICADO	11,1	9,78
120	No amplificado	< 2	No amplificado	1,01	1,01	No amplificado	< 2	< 2
123	No amplificado	< 2	No amplificado	1,2	0,91	No amplificado	< 2	< 2
133	No amplificado	< 2	No amplificado	0,95	< 2	No Evaluable		
134	No amplificado	< 2	No amplificado	1,02	0,9	No amplificado	< 2	< 2
135	No amplificado	< 2	No amplificado	0,93	1,09	No amplificado	< 2	< 2
136	No amplificado	< 2	No amplificado	1,04	1,04	No amplificado	< 2	< 2

**Tabla 11. Resultados del análisis de las 3 técnicas de Hibridación *in situ***

Las figuras 20, 21 y 22 muestran tres casos estudiados mediante dc-CISH en nuestra serie, correspondiendo a un caso no amplificado, un caso con amplificación en “clusters” y otro con amplificación en “double minutes”.

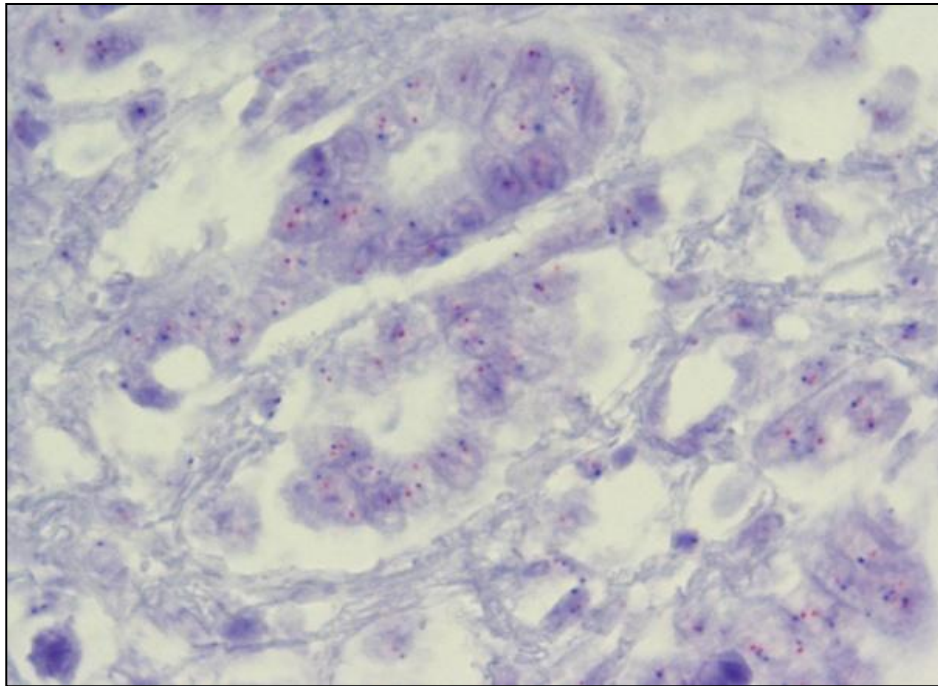


Figura 20. dc-CISH *HER2*/CEP17. No Amplificado. # 17.40x

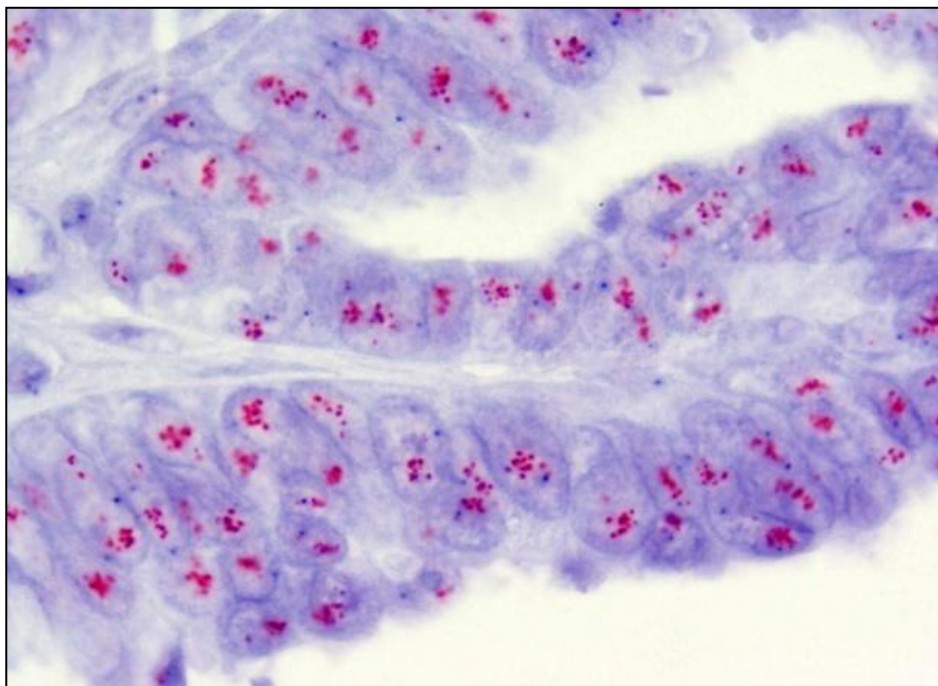


Figura 21. dc-CISH *HER2*/CEP17. Amplificado. D Minutes. #119. 100x



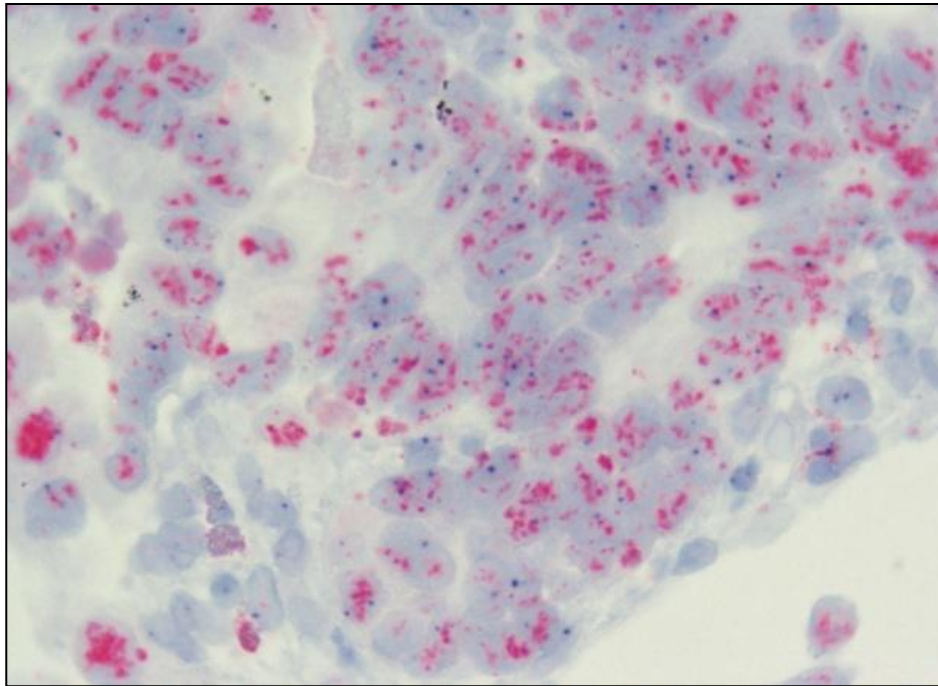


Figura 22. dc-CISH *HER2*/CEP17. Amplificado. Clusters. # 91. 40x

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

De los 174 casos inicialmente recogidos para su inclusión en este trabajo, se presentan a continuación los resultados del análisis estadístico realizado en 166 de ellos. Los 8 casos restantes no se han incluido por falta de seguimiento clínico adecuado que impide una correlación clínico-patológica adecuada (4 casos), ausencia de material tumoral en la muestra remitida al laboratorio y ausencia de otras muestras neoplásicas del mismo paciente (2 casos), o muestra no valorable (ausencia de material tumoral) tras la realización de alguno de los métodos diagnósticos realizados (2 casos).

Las principales variables se han analizado de acuerdo con 4 criterios predeterminados en base a su importancia clínica y pronóstica:

- El tipo histológico (intestinal vs no intestinal) según la clasificación de Laurén,
- El resultado de la sobreexpresión de HER2 medido por IHQ y agrupando los casos en negativos (resultados 0,1,2) y positivos (3),
- El resultado de la amplificación de *HER2* por el método de FISH (amplificado vs no amplificado),
- El resultado de la amplificación de *HER2* por el método de SISH con dos ratios diferentes como puntos de corte para considerar un caos como amplificado, ratio  $\geq 2$  y ratio  $\geq 3$ . Este análisis de los resultados de SISH se presenta separado para cada uno de los dos evaluadores.

Se presentan también los resultados del estudio desglosados para la subpoblación de pacientes metastásicos, en la cual se ha realizado un análisis de la supervivencia global y libre de progresión tumoral así como del resultado del tratamiento aplicado y de la posible influencia de la sobreexpresión o amplificación de *HER2* en dichos parámetros.

Igualmente se presentan los datos del análisis de correlación y de coherencia entre los resultados obtenidos a la hora de determinar el estado de *HER2* con cada uno de los métodos diagnósticos utilizados.



## RESULTADOS DEL ESTUDIO CLÍNICO – PATOLÓGICO

Los resultados del análisis descriptivo de las variables clínicas más representativas se detallan a continuación. Se especifican separados para dos poblaciones diferentes; por un lado el grupo completo de 166 casos y por otro el subgrupo que aglutina los 148 pacientes metastásicos.

### POBLACION GLOBAL

La Tabla 12 describe los principales parámetros clínicos de la población incluida en el estudio. Del total de 166 casos estudiados, 86 (51.8%) debutaron como enfermedad diseminada y 62 (37,34%) desarrollaron metástasis a distancia durante la evolución de su enfermedad. La edad media al diagnóstico fue de 66 años y en el 72.3% de los casos el paciente fue varón.

**Tabla 8. Características Clínicas de la Población Global**

Características Clínicas Población Total		Valor
Edad (años)	N	166
	Media (SD)	66 (9.9)
	Mediana	68
	Rango (Min – Max)	31-83
Sexo: Hombre/Mujer	N(%)/ N(%)	120 (72.3)/46 (27.7)
Tipo Histológico Intestinal/ Difuso/ Indeterminado/	N(%)/ N(%)/N(%)	85(51.2)/ 47 (28.3)/ 33 (19.9)
Metastásicos: Si/No	N(%)/ N(%)	148 (89.2)/ 18 (10.8)

La edad en este grupo no sigue una distribución normal por lo cual aplicamos un test no paramétrico de comparación de medias (Wilcoxon-Mann Whitney) entre los grupos con tipo histológico intestinal vs no intestinal.

		Intestinal	No intestinal	Total
<b>Edad (años)</b>	<b>N</b>	<b>85</b>	<b>81</b>	<b>166</b>
	Media (SD)	68.16(8.07)	63.58(11.03)	65.93(9.87)
	Mediana	69.00	66.00	68.00
	p25% - p75%	63.00 - 74.00	59.00 - 71.00	61.00 - 73.00
	p10% - p90%	55.00 - 78.00	47.00 - 76.00	54.00 - 77.00
	Rango (Min – Max)	43.00 - 83.00	31.00 - 82.00	31.00 - 83.00

Test de Wilcoxon	
Estadístico	5941.5000
t aproximación	
One-Sided Pr < Z	0.0043
Two-Sided Pr >  Z	0.0087

El resultado indica que existe una diferencia estadísticamente significativa en los valores medios de la edad, según el tipo histológico.

Asimismo analizamos si existe diferencia en la incidencia de un tipo histológico frente al otro de acuerdo al sexo.

	Intestinal		No intestinal		Total	
	N	%	N	%	N	%
<b>Hombre</b>	66	77.65	54	66.67	120	72.29
<b>Mujer</b>	19	22.35	27	33.33	46	27.71
<b>Total</b>	85	100.0	81	100.0	166	100.0

<b>Estadístico</b>	<b>DF</b>	<b>Value</b>	<b>Prob</b>
<b>Chi-Square</b>	1	2.4964	0.1141

El resultado de la aplicación del test Chi-cuadrado indica que no existe diferencia en la incidencia del tipo histológico debida al sexo.

De igual manera se analiza si existe asociación entre la presentación como enfermedad metastásica y el tipo histológico.

<b>MTs. al Dco</b>	<b>Intestinal</b>		<b>No intestinal</b>		<b>Total</b>	
	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>NO</b>	37	43.53	38	46.91	75	45.18
<b>SI</b>	45	52.94	41	50.62	86	51.81
<b>Desconocido</b>	3	3.53	2	2.47	5	3.01
<b>Total</b>	<b>85</b>	<b>100.0</b>	<b>81</b>	<b>100.0</b>	<b>166</b>	<b>100.0</b>

<b>Test Cochran-Mantel-Haenszel</b>				
<b>Estadístico</b>	<b>Hipotesis Alternativa</b>	<b>DF</b>	<b>Valor</b>	<b>Prob</b>
<b>1</b>	<b>Nonzero Correlation</b>	1	0.2678	0.6048
<b>2</b>	<b>Row Mean Scores Differ</b>	1	0.2678	0.6048
<b>3</b>	<b>General Association</b>	2	0.3013	0.8601

El resultado de la aplicación del test Chi-Square y Cochran-Mantel-Haenszel indica que no existe asociación estadísticamente significativa entre el tipo histológico y la presencia de metástasis en el diagnóstico inicial.

## POBLACIÓN DE PACIENTES METASTÁSICOS

La población de pacientes con metástasis a distancia se compone de 148 casos, que representan el 89,16% de la población total de pacientes incluidos en el estudio. Las principales características clínico-patológicas de este grupo de pacientes se resumen en la tabla 13.

**Tabla 9. Características clínico-patológicas de la población metastásica.**

Características Clinipatológicas		Valor
Edad (años)	N	148
	Media (SD)	67 (9.6)
	Mediana	68
	Rango (Min – Max)	33-83
Sexo: Hombre/Mujer	N(%) / N(%) 111 (75.0)/37 (25.0)	
Tipo Histológico: Intestinal/ Difuso/ Indeterminado/	N(%) / N(%) / N(%) 75(50.7) / 41 (27.7) / 31 (20.9)	
Localización de las metástasis		
Hepáticas	N(%)	57 (38.5)
Pulmonares	N(%)	17(11.5)
Ganglios torácicos	N(%)	15 (10.1)
Ganglios Abdominales	N(%)	90 (60.8)
Óseas	N(%)	8 (5.4)
Ováricas	N(%)	5(3.4)
Carcinomatosis peritoneal	N(%)	48 (32.4)
SNC al diagnóstico	N(%)	1 (0.7)

Al igual que con la población global del estudio, se analizó si existían diferencias significativas entre los pacientes con adenocarcinomas de tipo intestinal o no intestinal en relación a las variables edad, sexo, diagnóstico inicial como enfermedad metastásica y localización de las metástasis.

## ANÁLISIS DE LA RELACIÓN EDAD – TIPO HISTOLÓGICO

La edad no sigue una distribución normal. Aplicamos un test no paramétrico de comparación de medias (Wilcoxon-Mann Whitney) entre los grupos con tipo histológico intestinal vs no intestinal.

		Intestinal	No intestinal	Total
Edad(años)	N	75	73	148
	Media (SD)	68.16(8.03)	64.95(10.73)	66.57(9.56)
	Mediana	70.00	67.00	68.00
	p25% - p75%	63.00 - 74.00	60.00 - 72.00	62.00 - 73.50
	p10% - p90%	56.00 - 77.00	49.00 - 76.00	54.00 - 77.00
	Rango (Min – Max)	43.00 - 82.00	33.00 - 83.00	33.00 - 83.00
<b>Test de Wilcoxon</b>				
Estadisticoc		4994.5000		
t Approximation				
One-Sided Pr < Z		0.0454		
Two-Sided Pr >  Z		0.0908		

El resultado indica que no existe diferencia estadísticamente significativa en los valores medios de la edad.

Calculamos el IC95 de la media de edad, para cada uno de los dos tipos histológicos.

Tipo Histológico	N	Media	CL 95%	
Intestinal	75	68.160	66.002	70.318
No intestinal	73	64.945	62.758	67.132

## ANÁLISIS DE LA RELACIÓN SEXO - TIPO HISTOLÓGICO

Tipo histológico	Intestinal		No intestinal		Total	
	N	%	N	%	N	%
Hombre	60	80.00	51	69.86	111	75.00
Mujer	15	20.00	22	30.14	37	25.00
Total	75	100.0	73	100.0	148	100.0
Estadístico	DF		Valor		Prob	
Chi-cuadrado	1		2.0274		0.1545	

El resultado de la aplicación del test Chi-cuadrado indica que no existe diferencia en la incidencia de tipo histológico debida al sexo.

## ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DE METÁSTASIS EN EL DIAGNÓSTICO INICIAL Y EL TIPO HISTOLÓGICO

El resultado de la aplicación del test Chi-cuadrado y Cochran-Mantel -Haenszel indica que no existe asociación estadísticamente significativa entre la presencia de metástasis en el diagnóstico inicial y el tipo histológico.

MTs al Diagnóstico	Intestinal		No intestinal		Total	
	N	%	N	%	N	%
NO	27	36.00	30	41.10	57	38.51
SI	45	60.00	41	56.16	86	58.11
Desconocido	3	4.00	2	2.74	5	3.38
Total	75	100.0	73	100.0	148	100.0

Cochran-Mantel-Haenszel Statistics				
Estadístico	Hipótesis alternativa	DF	Value	Prob
1	Nonzero Correlation	1	0.5024	0.4784
2	Row Mean Scores Differ	1	0.5024	0.4784
3	General Association	2	0.5135	0.7736

## LOCALIZACIÓN DE LAS METÁSTASIS SEGÚN EL TIPO HISTOLÓGICO

**Tabla 10. Localización de las metástasis según el tipo histológico**

	Intestinal	No intestinal	p-value
Mts hepáticas	39 (52.00%)	18(24.66%)	<b>0.0006</b>
Mts pulmonares	12 (16.00%)	5 (6.85%)	0.0809
Mts. ganglionares torácicas	10 (13.33%)	5 (6.85%)	0.1913
Mts. ganglionares abdominales	48 (64.00%)	42 (57.53%)	0.4205
Carcinomatosis peritoneal.	15 (20.00%)	33 (45.21%)	<b>0.0011</b>
Mts. ováricas	1 (1.33%)	4 (5.48%)	0.2061
Mts óseas	2 (2.67%)	6(8.22%)	0.1635
Mts en SNC	0 (0%)	1 (1.37%)	0.4932

Como se detalla en la tabla 315, existen diferencias estadísticamente significativas en la aparición de metástasis hepáticas y carcinomatosis peritoneal entre los carcinomas de tipo intestinal y no intestinal en nuestra serie, siendo más frecuentes las metástasis hepáticas en los carcinomas intestinales y la carcinomatosis peritoneal en los no intestinales (difusos e indeterminados).

## TIPO DE TRATAMIENTO RECIBIDO

### Tratamiento administrado como 1ª línea.

Tratamiento primera línea	N	%
Doblete Platino/Fluoropirimidinas	34	23.0
Doblete Platino/Taxano	29	19.6
Monoterapia	11	7.4
Triplete	25	16.9
Trastuzumab + Quimioterapia	20	13.5
Cirugia	2	1.4
Otros dobletes	2	1.4
Ninguno	25	16.9
Total	148	100.0

### Tratamiento administrado como 2ª línea.

Tratamiento segunda línea	N	%
Doblete Platino/Fluoropirimidinas	4	2.7
Doblete Platino/Taxano	4	2.7
Monoterapia	27	18.2
Triplete	8	5.4
Trastuzumab + Quimioterapia	2	1.4
Cirugia	3	2.0
Otros dobletes	13	8.8
Ninguno	87	58.8
Total	148	100.0



## ANÁLISIS DEL TIEMPO HASTA LA PROGRESIÓN TUMORAL

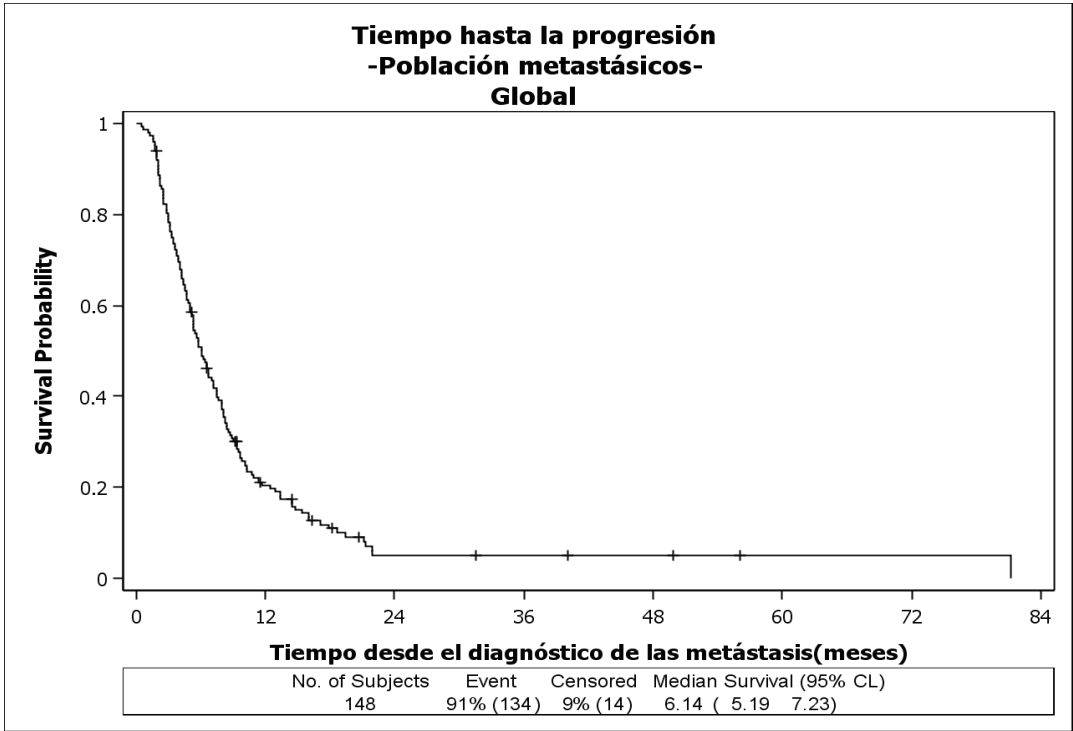
Se define el tiempo hasta la progresión como el tiempo transcurrido desde la fecha en que se realiza el diagnóstico de la metástasis hasta la fecha en que el paciente progresa o muere por progresión de la enfermedad.

Un paciente se censura si no progresa. En este caso el tiempo hasta la progresión se calcula como el tiempo transcurrido desde la fecha en que se diagnostica la metástasis hasta la fecha del último contacto.

Se aplica un modelo de Kaplan Meyer para toda la población de pacientes metastásicos con los siguientes resultados:

Cuartiles Estimados			
Percentil		Intervalo confianza 95%	
		[Inferior]	Superior]
75	10.1840	8.5742	13.3049
50	6.1432	5.1905	7.2273
25	3.3180	2.7595	4.1393

La mediana de tiempo hasta progresión es de 6.14 meses con IC95% (5.19, 7.23). De manera gráfica lo representamos como:



## TIEMPO HASTA LA PROGRESIÓN TUMORAL SEGÚN EL TIPO HISTOLÓGICO

Se definen dos grupos de pacientes en base al tipo histológico en el diagnóstico inicial del cáncer, intestinal vs no intestinal (difusos e indeterminados en la clasificación de Laurén). Se aplica un modelo de Kaplan Meyer presentando los resultados a continuación.

En el subgrupo con tipo histológico intestinal:

Cuartiles Estimados			
Percentil	Punto estimado	Intervalo confianza 95%	
		[Inferior]	Superior]
75	13.3377	9.6583	15.9658
50	7.5230	5.3548	9.3298
25	3.8108	2.9238	4.8949

La mediana de tiempo hasta la progresión es 7.52 meses, IC95% (5.35, 9.33).

En el subgrupo con tipo histológico no intestinal:

Cuartiles Estimados			
Percentil	Punto Estimado	Intervalo confianza 95%	
		[Inferior]	Superior]
75	8.3443	6.7017	10.3154
50	5.2562	4.4350	6.4389
25	3.0880	2.5624	4.2707

La mediana de tiempo hasta la progresión es 5.26 meses, IC95% (4.44, 6.44)

Resumen del número de eventos y casos censurados.					
estrato	Tipo histologico	Total	Eventos	Censurados	% Censurados
1	Intestinal	75	65	10	13.33
2	No intestinal	73	69	4	5.48
Total		148	134	14	9.46

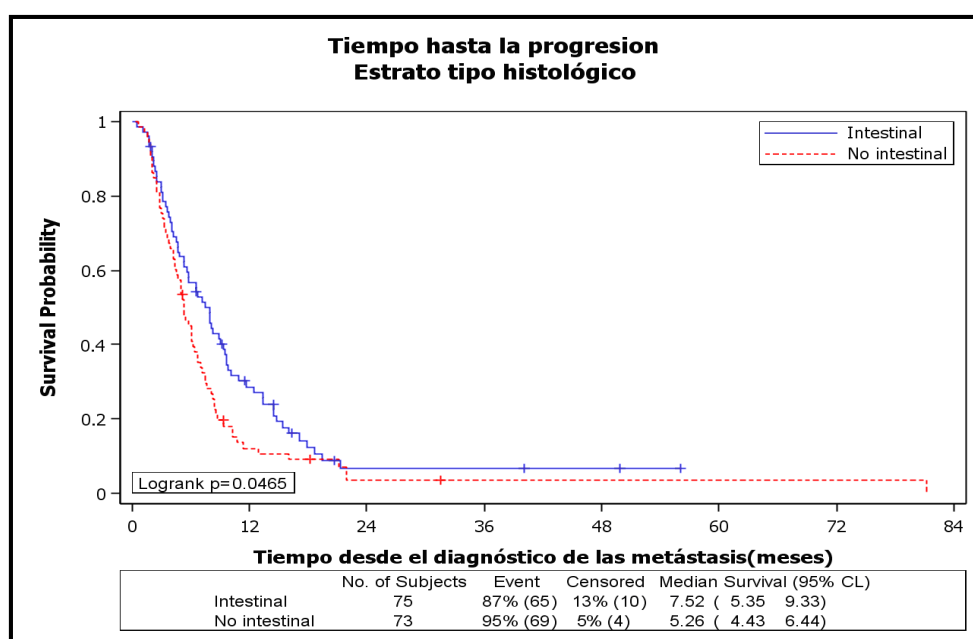
El test de Log Rank ( $p=0.0465$ ) indica que existe una diferencia estadísticamente significativa en el tiempo hasta la progresión, debida al tipo histológico. También aplicamos el test de Breslow (ó test de Wilcoxon) y el test de Tarone-Ware con los resultados siguientes:

Test	Chi-cuadrado	DF	Pr >Chi-cuadrado
Log-Rank	3.9644	1	0.0465
Wilcoxon	3.9796	1	0.0461
Tarone	4.4595	1	0.0347

La aplicación del modelo de Cox genera similares resultados:

HR (intestinal vs no intestinal): 0.707; IC95% (0.502, 0.997);  $p=0.0479$ .

Este resultado indica que el tipo histológico no intestinal es un factor de riesgo para la progresión.

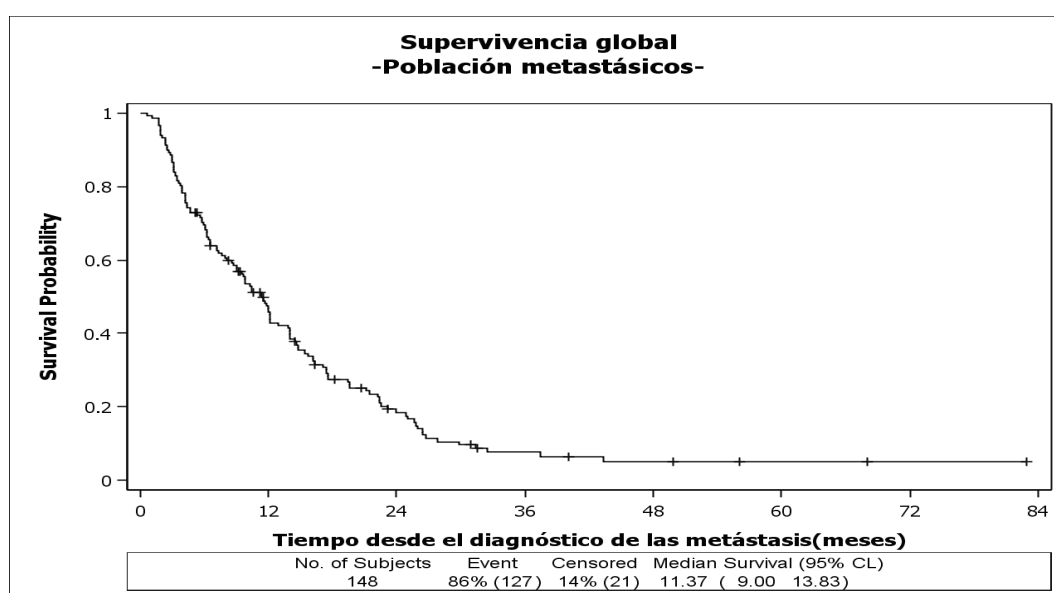


## ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL EN EL GRUPO DE PACIENTES METASTÁSICOS.

Se define el tiempo de supervivencia global como el tiempo transcurrido desde la fecha en que se diagnostica la metástasis hasta la fecha de éxitus. Un paciente se censura si está vivo. En este caso el tiempo de supervivencia global se calcula como el tiempo transcurrido desde la fecha en que se diagnostica la metástasis hasta la fecha de último contacto. Se aplica un modelo de Kaplan Meyer con los siguientes resultados

Cuartiles Estimados			
Percentil	Punto estimado	Intervalo confianza 95%	
		[Inferior	Superior]
75	21.1564	16.1301	24.8686
50	11.3666	9.0013	13.8305
25	4.3200	3.6137	6.2746

La mediana de supervivencia es 11.37 meses; IC95% (9.00, 13.83)



## ANALISIS DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL ESTRATIFICANDO LOS PACIENTES SEGÚN EL TIPO HISTOLÓGICO.

Se aplica un modelo de Kaplan Meyer presentando los resultados a continuación.

En el subgrupo con tipo histológico intestinal los resultados son

Cuartiles Estimados			
Percentil	Punto estimado	Intervalo confianza 95%	
		[Inferior]	Superior]
75	24.8686	21.3863	27.8581
50	14.5532	12.0237	21.1564
25	5.9461	3.9750	11.5309

La mediana del tiempo de supervivencia es 14.55 meses, IC95% (12.02, 21.16)

En el subgrupo con tipo histológico no intestinal los resultados son

Cuartiles Estimados			
Percentil	Punto estimado	Intervalo confianza 95%	
		[Inferior]	Superior]
75	14.3890	11.3009	17.4113
50	7.3587	6.2418	10.3154
5	3.8436	2.9895	6.0447

La mediana del tiempo de supervivencia es 7.36 meses, IC95% (6.24, 10.31)

Resumen del número de eventos y casos censurados.					
Estrato	Tipo histologico	Total	Eventos	Censurados	% censurado
1	Intestinal	75	61	14	18.67
2	No intestinal	73	66	7	9.59
Total		148	127	21	14.19

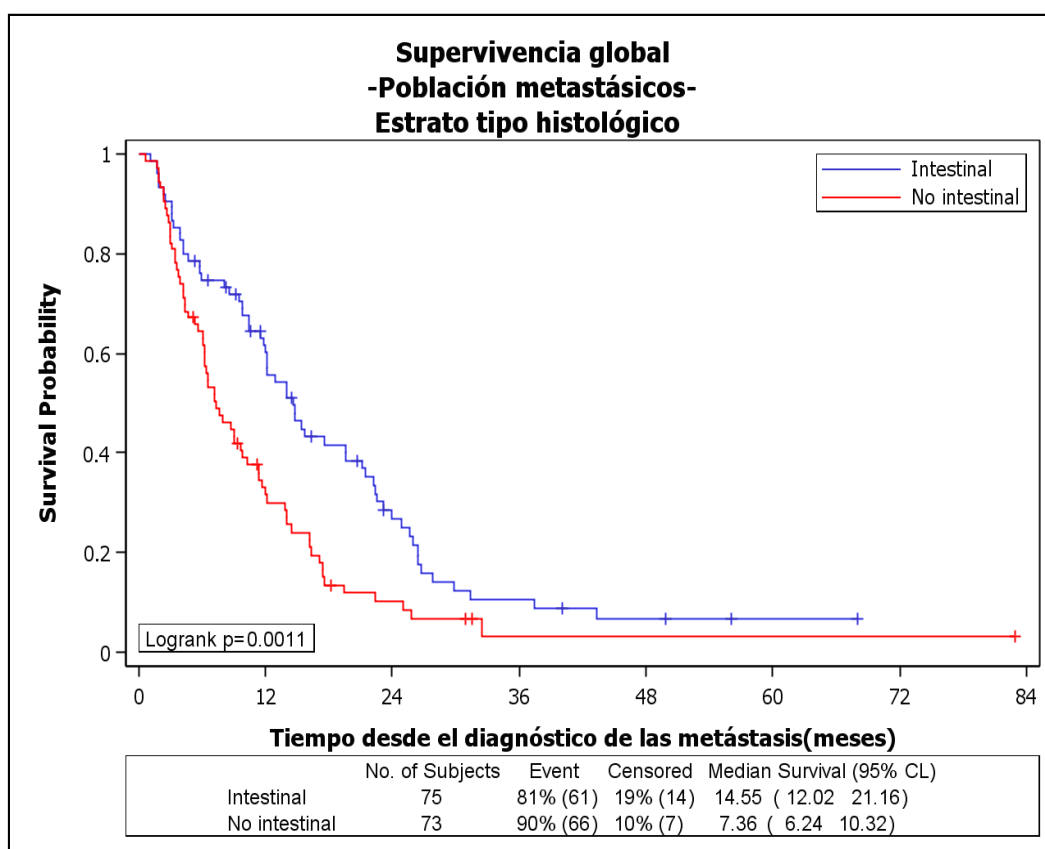
El test de Log Rank ( $p=0.0011$ ) indica que existe una diferencia estadísticamente significativa en el tiempo de supervivencia, debida al tipo histológico.

Este resultado se confirma aplicando también el test de Breslow (ó test de Wilcoxon) y el test de Tarone-Ware con los resultados siguientes:

Test de comparación de los estratos			
Test	Chi-cuadrado	DF	Pr > Chi-cuadrado
Log-Rank	10.6685	1	0.0011
Wilcoxon	10.8354	1	0.0010
Tarone	11.9009	1	0.0006

La aplicación del modelo de Cox genera similares resultados:

HR (intestinal vs no intestinal): 0.558 ; IC95% (0.329, 0.796);  $p=0.0013$



## EFICACIA DEL TRATAMIENTO

Resultados del tratamiento quimioterápico según los criterios RECIST en la población completa de pacientes metastásicos: 148 (89.16% del total de los incluidos en el estudio).

Respuesta	Nº casos	%	IC95%
Enfermedad Estable	27	18.24	[ 12.38; 25.42]
Respuesta Parcial	33	22.30	[ 15.87; 29.86]
Respuesta Completa	15	10.14	[ 5.78; 16.17]
Progresion Tumoral	73	49.32	[ 41.02; 57.66]

Estratificados según el tipo histológico

	Intestinal		No intestinal		Total	
	N	%	N	%	N	%
Enfermedad Estable	15	20.00	12	16.44	27	18.24
Respuesta Parcial	20	26.67	13	17.81	33	22.30
Respuesta Completa	11	14.67	4	5.48	15	10.14
Progresion Tumoral	29	38.67	44	60.27	73	49.32
Total	75	100.0	73	100.0	148	100.0



Resultados en la población que recibió al menos 1 ciclo de quimioterapia

Respuesta	Nº casos	IC95%
Enfermedad Estable	27	[ 14.99; 30.31]
Respuesta Parcial	33	[ 19.24; 35.57]
Respuesta Completa	15	[ 6.99; 19.32]
Progresion Tumoral	48	[ 30.36; 48.23]

Estratificados de acuerdo al tipo histológico

Tipo histológico	Intestinal		No intestinal		Total	
	N	%	N	%	N	%
Enfermedad Estable	15	23.81	12	20.00	27	21.95
Respuesta Parcial	20	31.75	13	21.67	33	26.83
Respuesta Completa	11	17.46	4	6.67	15	12.20
Progresion Tumoral	17	26.98	31	51.67	48	39.02
Total	63	100.0	60	100.0	123	100.0

---

## EFICACIA DEL TRATAMIENTO CON TRASTUZUMAB

Este análisis se ha realizado sobre el grupo de pacientes que recibieron al menos un ciclo de quimioterapia y que se ha denominado población de eficacia. Se han definido dos grupos de pacientes:

Pacientes con amplificación o sobreexpresión positiva para HER2 y tratados con quimioterapia (QT) más Trastuzumab (Grupo 1)

Pacientes no amplificados o sin sobreexpresión para HER2 y tratados con QT estándar sin Trastuzumab (Grupo 2).

Se analiza la asociación de la respuesta tumoral obtenida con el grupo al que pertenece el paciente. Para ello se aplica el test de Chi-cuadrado ó el test de Fisher con un nivel de significación  $\alpha=0.05$ . El análisis se ha realizado de manera independiente para cada una de las técnicas de determinación del estado de HER2 utilizadas y se detalla en el apartado correspondiente.

## RESULTADOS DEL ESTUDIO DE INMUNOHISTOQUIMICA PARA LA DETERMINACION DE HER2

### RESULTADOS EN LA POBLACIÓN GLOBAL DEL ESTUDIO

El estudio IHQ pudo realizarse de manera correcta para su análisis estadístico y correlación con las otras técnicas diagnósticas en 166 casos. De acuerdo a lo expuesto en material y métodos se clasificó la intensidad del resultado de tinción en 0, 1, 2 y 3, asumiendo el grupo puntuado con 3 como el grupo de pacientes con sobreexpresión del receptor HER2 de cara a la comparación de resultados con los pacientes sin sobreexpresión. La distribución de los pacientes fue

IHQ	N	%
0	139	83.7
1	5	3.0
2	6	3.6
3	16	9.6
Total	166	100.0

### RESULTADO IHQ SEGÚN LA EDAD DE LOS PACIENTES:

		IHQ=0	IHQ=1	IHQ=2	IHQ=3
Edad (años)	N	139	5	6	16
	Media (SD)	66.04 (10.02)	70.00 (5.96)	63.50 (8.09)	64.63 (10.31)
	Mediana	68.00	68.00	62.50	66.00
	p25% - p75%	61.00 - 73.00	67.00 - 74.00	55.00 - 73.00	60.50 - 72.00
	p10% - p90%	51.00 - 77.00	63.00 - 78.00	55.00 - 73.00	49.00 - 77.00
	Min - Max	31.00 - 83.00	63.00 - 78.00	55.00 - 73.00	40.00 - 79.00

Aplicamos un test no paramétrico de comparación de medias (Kruskal Wallis) entre los grupos con valor IHQ 0, 1, 2, 3.

Test de Kruskal-Wallis	
Chi-cuadrado	1.9469
DF	3
Pr > Chi-cuadrado	0.5835

El resultado indica que no existe diferencia estadísticamente significativa en los valores de la edad entre los distintos grupos de pacientes con valor de IHQ 0, 1, 2, 3.

IHQ	N	Media	Limites Confianza 95%	
1	5	70.0000	61.2427	78.7573
0	139	66.0360	64.3751	67.6969
3	16	64.6250	59.7295	69.5205
2	6	63.5000	55.5057	71.4943

## RESULTADO IHQ SEGÚN EL SEXO DE LOS PACIENTES

IHQ	0		1		2		3		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Hombre	97	69.78	5	100.0	4	66.67	14	87.50	120	72.29
Mujer	42	30.22	0	0	2	33.33	2	12.50	46	27.71
Total	139	100.0	5	100.0	6	100.0	16	100.0	166	100.0

Estadístico de Cochran-Mantel-Haenszel				
Estadístico	Hipótesis alternativa	DF	Valor	Prob
1	Nonzero Correlation	1	2.1588	0.1418
2	Row Mean Scores Differ	3	4.2689	0.2339
3	General Association	3	4.2689	0.2339

El resultado de la aplicación del test Cochran-Mantel-Haenszel indica que no existe asociación estadísticamente significativa entre el sexo y los valores de IHQ.

## RESULTADO IHQ SEGÚN LA PRESENCIA O NO DE METASTASIS EN EL DIAGNOSTICO INICIAL.

Se analizó la posible relación entre la presencia de metástasis en el diagnóstico inicial de los pacientes y la mayor o menor frecuencia de sobreexpresión del receptor HER2 medido por inmunohistoquímica.

MTS	0		1		2		3		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
No	68	48.92	1	20.00	0	0.	6	37.50	75	45.18
Sí	68	48.92	3	60.00	6	100.0	9	56.25	86	51.81
Desconocido	3	2.16	1	20.00	0	0	1	6.25	5	3.01

Estadístico Cochran-Mantel-Haenszel				
Estadístico	Hipótesis Alternativa	DF	Valor	Prob
1	Nonzero Correlation	1	3.4114	0.0647
2	Row Mean Scores Differ	3	7.9755	0.0465
3	General Association	6	12.8775	0.0450

El resultado de la aplicación del test Cochran-Mantel-Haenszel indica que existe asociación estadísticamente significativa entre la presencia de metástasis a distancia en el diagnostico inicial y los valores de IHQ.

## POBLACION DE PACIENTES METASTASICOS

En la población de pacientes metastásicos la distribución de los resultados del análisis IHQ fue:

IHQ	N	%
<b>0</b>	122	82.4
<b>1</b>	5	3.4
<b>2</b>	6	4.1
<b>3</b>	15	10.1
<b>Total</b>	148	100.0

## RESULTADOS DEL ANÁLISIS IHQ SEGÚN LA LOCALIZACIÓN DE LAS METÁSTASIS

En la siguiente tabla se resume el resultado del análisis entre la localización de las metástasis y la sobreexpresión del receptor HER2. Los resultados se expresan en número total de casos y, entre paréntesis, el porcentaje que representan con respecto al total de casos con el mismo resultado inmunohistoquímico. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los resultados inmunohistoquímicos entre las distintas localizaciones metastásicas.

	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	P- value
<b>Mts hepáticas</b>	43 (35.25%)	3 (60.00%)	4 (66.67%)	7 (46.67%)	0.2694
<b>Mts pulmonares</b>	12 (9.84%)	1 (20.%)	0 (0%)	4 (26.67%)	0.1848
<b>Mts ganglionares torácicas</b>	11 (9.02%)	1 (20.00%)	1 (16.67%)	2 (13.33%)	0.7666
<b>Mts gang. abdominales</b>	70 (57.38%)	5 (100.0%)	4 (66.67%)	11 (73.33%)	0.1819
<b>Carcinomatosis peritoneal</b>	45 (36.89%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (20.00%)	0.0604
<b>Mts ováricas</b>	5 (4.10%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0.7782
<b>Mts óseas</b>	8 (6.56%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0.6171
<b>Mts en SNC</b>	1 (0.82%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0.9754



## ANÁLISIS DEL TIEMPO HASTA LA PROGRESIÓN TUMORAL

Se definen dos grupos de pacientes en base a los valores de IHQ. Un grupo comprende los pacientes con valores de IHQ 0, 1, 2 (IHQ negativa) y otro el conjunto de pacientes con valor de IHQ igual a 3 (IHQ positiva).

Se aplica un modelo de Kaplan Meyer:

Resumen del número de eventos y casos censurados					
Estrato	IHQ	Total	eventos	Censurados	% Censurados
1	AMPLIFICADO	15	12	3	20.00
2	NO AMPLIFICADO	133	122	11	8.27
Total		148	134	14	9.46

En el **subgrupo con IHQ positiva:**

Cuartiles Estimados			
Percentil	Punto estimadoe	Intervalo Confianza 95%	
		Inferior	Superior
75	14.6518	7.9829	.
50	7.9829	5.8147	13.3377
25	5.7819	5.2234	7.9829

LA mediana del tiempo hasta la progresión es 7.98 meses, IC95% (5.81, 13.34)

En el **subgrupo con IHQ Negativa:**

Cuartiles Estimados			
Percentil	Punto Estimado	Intervalo Confianza 95%	
		[Lower	Upper)
75	9.6583	8.3443	12.4179
50	5.4534	4.6649	6.7017
25	3.1209	2.5624	3.9093

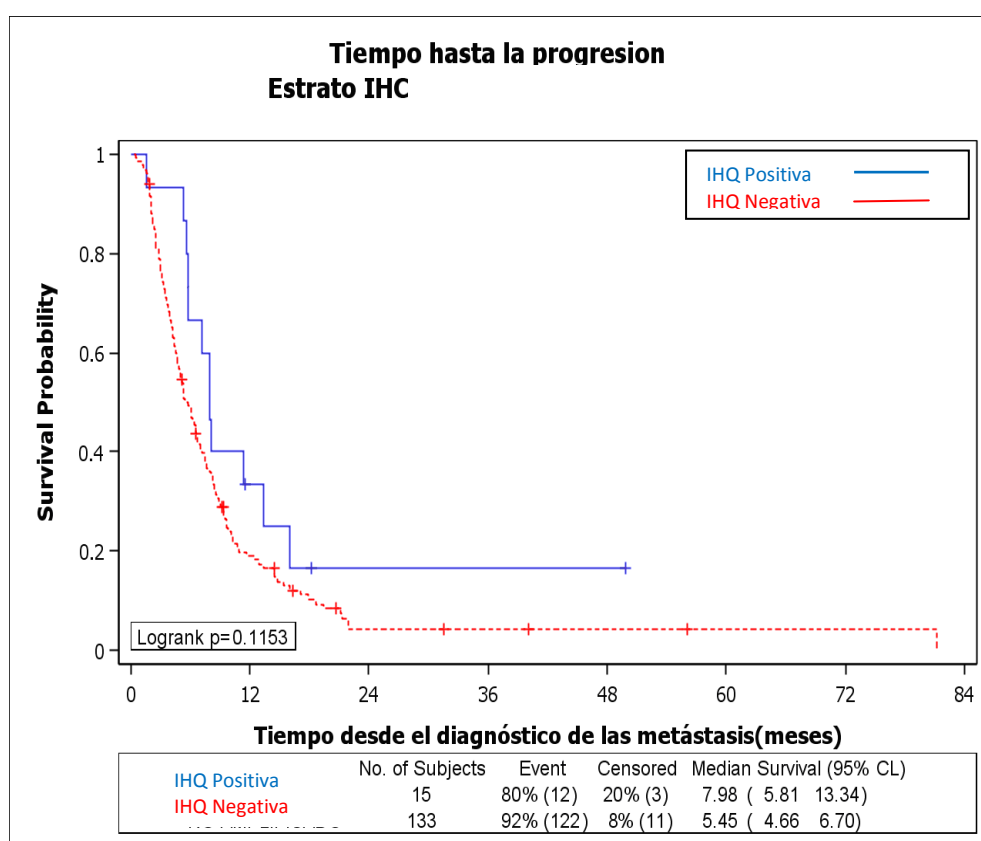
La mediana del tiempo hasta la progresión es 5.45 meses, IC95% (4.66, 6.70)

El test de Log Rank ( $p=0.1153$ ) indica que no existe una diferencia estadísticamente significativa en el tiempo hasta la progresión, debida al resultado IHQ. También aplicamos el test de Breslow (ó test de Wilcoxon) y el test de Tarone-Ware con los resultados siguientes:

Test de Igualdad de los Estratos			
Test	Chi-cuadrado	DF	Pr >Chi-cuadrado
Log-Rank	2.4799	1	0.1153
Wilcoxon	3.3488	1	0.0673
Tarone	2.9972	1	0.0834

La aplicación del modelo de Cox genera similares resultados:

HR (IHQ positiva vs Negativa): 0.624; IC95% (0.344, 1.130);  $p=0.1193$



## ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL DE ACUERDO AL RESULTADO IHQ

A efectos del análisis de supervivencia, se definen dos grupos de pacientes en base a los valores de IHQ, el grupo de pacientes con valores de IHQ iguales a 0, 1, 2, (IHQ negativa) y el grupo de pacientes con valor de IHQ igual a 3 (IHQ positiva).

Resultados del Modelo Kaplan Meyer

### IHQ positiva

Cuartiles Estimados			
Percentil	Puntos Estimados	Intervalo Confianza 95%	
		[Inferior	Superior]
75	25.9527	21.3863	.
50	21.3863	14.8160	.
25	14.8160	8.0486	21.3863

### IHQ negativa

Cuartiles Estimados			
Percentil	Puntos Estimados	Intervalo Confianza 95%	
		[Inferior	Superior]
75	17.5756	14.3890	23.1275
50	9.8226	7.3587	12.0894
25	4.2050	3.3837	5.9461

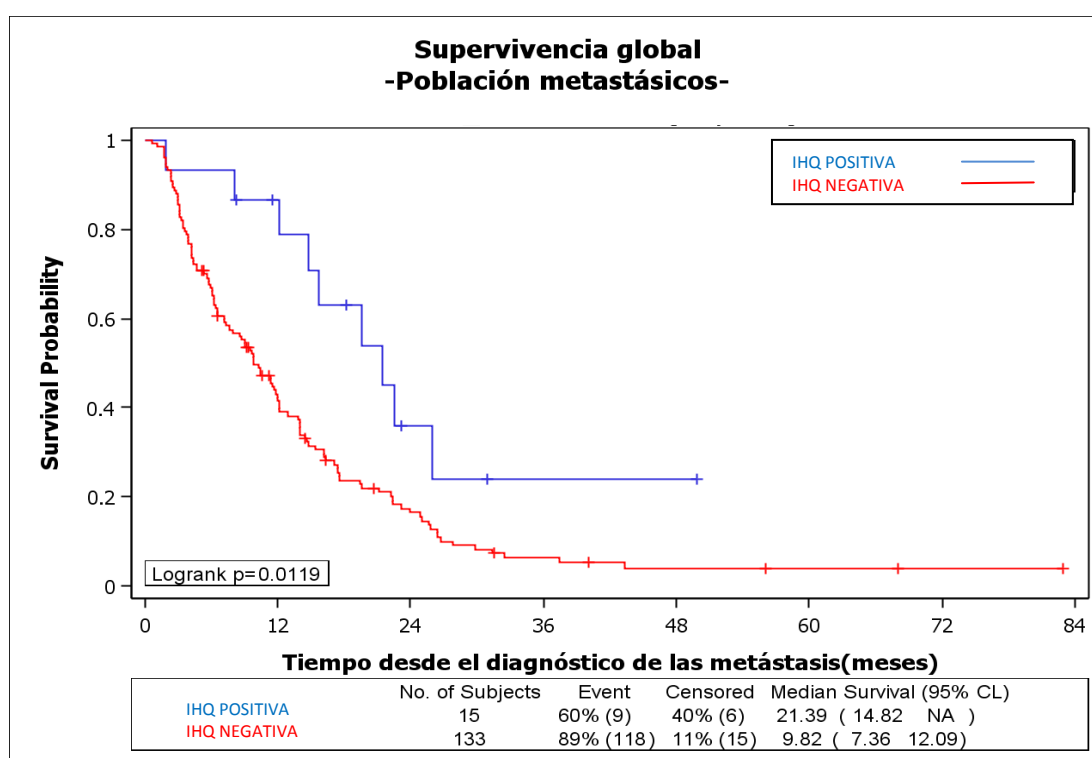
Aplicando los tests de comparación entre los estratos Log-rank, Breslow (ó Wilcoxon) y Tarone-Ware el resultado es:

Test de comparación entre estratos			
Test	Chi-cuadrado	DF	Pr > Chi-cuadrado
<b>Log-Rank</b>	6.3211	1	0.0119
<b>Wilcoxon</b>	7.0390	1	0.0080
<b>Tarone</b>	7.1493	1	0.0075

Existe diferencia significativa en la supervivencia global ( $p=0.0119$ ) asociada al valor de IHQ, siendo favorable al grupo de IHQ positiva.

Tabla resumen modelo Kaplan Meyer

Resumen de número de eventos y casos censurados					
Estrato	Nº sujetos	Evento(muerte)	Censurados	Mediana supervivencia	IC95%
IHQ POSITIVA	15	9 (60%)	6 (40%)	21.39	(14.82, NA)
IHQ NEGATIVA	133	118 (89%)	15 (11%)	9.82	(7.36, 12.09)
<b>Total</b>	148	127			



Resultado del modelo de Cox:

Hazard ratio (IHQ positiva vs negativa): 0.429; IC95% (0.218, 0.847)

El riesgo de muerte es menor en el grupo IHQ positiva que en el grupo IHQ negativa lo que se puede interpretar como que la sobreexpresión del receptor HER2 es un factor protector, es decir, de buen pronóstico de cara a la supervivencia global.

## EFICACIA DEL TRATAMIENTO CON TRASTUZUMAB SEGÚN RESULTADO IHQ

Se realizó un análisis de la asociación entre la respuesta al tratamiento administrado y el grupo al que pertenece el paciente de acuerdo con el estado de HER2 determinado por el método de IHQ. Se consideraron 2 grupos para su comparación, el grupo de pacientes con HER2 sobreexpresado y tratados con Trastuzumab (Grupo 1) y el grupo de pacientes con HER2 no sobreexpresado y tratados con quimioterapia (QT) estándar (Grupo 2). Para ello se aplica un test Chi-cuadrado (ó Fisher) con un nivel de significación  $\alpha=0.05$ .

	IHQ Positiva +Trastuzumab			IHQ Negativa + QT Estándar		
Respuesta	N	%	IC 95%	N	%	IC 95%
Enfermedad Estable	2	25.00	[3.19; 65.09]	19	19.79	[12.36; 29.17]
Respuesta Parcial	4	50.00	[15.70; 84.30]	23	23.96	[15.83; 33.75]
Respuesta Completa	2	25.00	[3.19; 65.09]	12	12.50	[6.63; 20.82]
Progresion Tumoral	0	00.00	[0.0; 0.0]	42	43.75	[33.64; 54.25]

La Respuesta Parcial en los grupos sobreexpresión + Trastuzumab vs no sobreexpresión + QT estándar (50% vs 23.96%) es similar o no difiere de manera estadísticamente significativa ( $p=0.2005$ ).

La Respuesta Completa en los grupos sobreexpresión + Trastuzumab vs no sobreexpresión + QT estándar (25% vs 12.50 %) no es significativamente distinta ( $p=0.2930$ )

No existe una probabilidad mayor de respuesta completa o parcial debida al grupo al que pertenece el paciente.

Existe un beneficio clínico mayor (100%) en el grupo con sobreexpresión + tratamiento con Trastuzumab frente al grupo no sobreexpresión + Quimioterapia estándar (56.25%) Este beneficio resulta estadísticamente significativo ( $p=0.0201$ ).

## RESULTADOS DEL ESTUDIO DE FISH PARA LA DETERMINACIÓN DE *HER2*

### RESULTADOS EN LA POBLACIÓN GLOBAL

Distribución de los pacientes de acuerdo al resultado de FISH.

<b>FISH</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>FISH no amplificado</b>	138	83.1
<b>FISH amplificado</b>	28	16.9
<b>Total</b>	166	100.0

### Análisis descriptivo de los casos con resultado amplificado por FISH

<b>Ratio FISH (&gt;2) N= 28</b>	
Media	5,99
IC95% Media	4,80 – 7,18
Std	3,06
Mediana	5,13
Q1	3,13
Q3	8,32
Rango intercuartílico	5,20
Rango (Min – Mmax)	2,10 – 12,30



## RESULTADO DE FISH SEGÚN LA EDAD DE LOS PACIENTES

		<b>FISH AMPLIFICADO</b>	<b>FISH NO AMPLIFICADO</b>	<b>total</b>
Edad (años)	N	138	28	166
	Media (SD)	66.09(10.06)	65.14(8.98)	65.93(9.87)
	Mediana	68.00	66.00	68.00
	p25% - p75%	61.00 - 73.00	61.50 - 72.50	61.00 - 73.00
	p10% - p90%	51.00 - 77.00	54.00 - 77.00	54.00 - 77.00
	Min - Max	31.00 - 83.00	40.00 - 79.00	31.00 - 83.00

Aplicamos un test no paramétrico de comparación de medias (Wilcoxon-Mann Whitney) entre los grupos con FISH amplificado vs no amplificado.

<b>Test de Wilcoxon para dos muestras</b>	
<b>Estadístico</b>	2158.0000
<b>t Approximation</b>	
<b>One-Sided Pr &lt; Z</b>	0.2198
<b>Two-Sided Pr &gt;  Z </b>	0.4396

El resultado indica que no existe diferencia estadísticamente significativa en los valores medios de la edad entre el grupo de pacientes con resultado FISH Amplificado y el grupo de pacientes con resultado FISH No Amplificado

Calculamos el IC95 de la media de edad, para cada uno de los dos grupos

<b>FISH</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Límites Confianza 95%</b>	
<b>Ratio FISH &lt;2</b>	138	66.0870	64.4238	67.7501
<b>Ratio FISH ≥2</b>	28	65.1429	61.4506	68.8351

## RESULTADO DE FISH DE ACUERDO AL SEXO DEL PACIENTE

	Ratio FISH <2		Ratio FISH ≥2		Total	
	N	%	N	%	N	%
<b>Hombre</b>	97	70.29	23	82.14	120	72.29
<b>Mujer</b>	41	29.71	5	17.86	46	27.71
<b>Total</b>	138	100.0	28	100.0	166	100.0

El resultado de la aplicación del test Chi-cuadrado indica que no existe diferencia en la incidencia de FISH de *HER2* amplificado debida al sexo.

Estadístico	DF	Value	Prob
<b>Chi-cuadrado</b>	1	1.6325	0.2014

## RESULTADO DE FISH SEGÚN LA PRESENCIA O NO DE METÁSTASIS EN EL DIAGNÓSTICO INICIAL

Mts al diagnóstico	Ratio FISH <2		Ratio FISH ≥2		Total	
	N	%	N	%	N	%
<b>No</b>	66	47.83	9	32.14	75	45.18
<b>Sí</b>	68	49.28	18	64.29	86	51.81
<b>Desconocido</b>	4	2.90	1	3.57	5	3.01
<b>Total</b>	138	100.0	28	100.0	166	100.0

Test de Cochran-Mantel-Haenszel				
Estadístico	Hipótesis Alternativa	DF	Valor	Prob
<b>1</b>	<b>Nonzero Correlation</b>	1	2.0353	0.1537
<b>2</b>	<b>Row Mean Scores Differ</b>	1	2.0353	0.1537
<b>3</b>	<b>General Association</b>	2	2.3006	0.3165

El resultado indica que no existe asociación estadísticamente significativa entre la presencia o no de metástasis en el diagnóstico inicial y la incidencia de FISH de *HER2* amplificado.

#### POBLACIÓN DE PACIENTES METASTASICOS

En la población de pacientes metastásicos la distribución de los resultados de FISH fue la siguiente:

Ratio FISH	N	%
Ratio FISH <2	121	81.8
Ratio FISH ≥2	27	18.2
Total	148	100.0

Los parámetros descriptivos en el subgrupo de pacientes con amplificación (ratio *HER2*/CEP17 ≥ 2) del gen *HER2* se resumen en la siguiente tabla:

Ratio FISH (≥2) N= 27	
Media	5,81
IC95% Media	4,64 – 9,98
Std	2,96
Mediana	5
Q1	3,13
Q3	8,32
Rango intercuartílico	5,20
Rango (Min – Mmax)	2,10 – 12,30

## RESULTADOS DEL ANÁLISIS FISH SEGÚN LA LOCALIZACIÓN DE LAS METÁSTASIS

En la tabla 15 se resume el resultado del análisis entre la localización de las metástasis y la amplificación del oncogén *HER2* determinada por FISH. Los resultados se expresan en número total de casos y, entre paréntesis, el porcentaje que representan con respecto al total de casos analizados.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los resultados de FISH para *HER2* entre las distintas localizaciones metastásicas.

**Tabla 15. Localización de las metástasis y resultado FISH**

	<b>Ratio FISH &lt;2</b>	<b>Ratio FISH ≥2</b>	
<b>Metastasis hepáticas</b>	43(35.54%)	14 (51.85%)	0.1152
<b>Metastasis pulmonares</b>	12 (9.92%)	5 (18.52%)	0.1987
<b>Mts ganglionares torácicas</b>	12 (9.92%)	3 (11.11%)	0.7380
<b>Mts ganglionares abdominales</b>	70 (57.85%)	20 (74.07%)	0.1184
<b>Carcinomatosis peritoneal</b>	43 (35.54%)	5 (18.52%)	0.0876
<b>Mts ováricas</b>	5 (4.13%)	0 (0%)	0.5850
<b>Mts óseas</b>	8 (6.61%)	0 (0%)	0.3516
<b>Mts en SNC</b>	1 (0.83%)	0 (0%)	1.0000

## ANÁLISIS DEL TIEMPO HASTA LA PROGRESIÓN TUMORAL.

Al igual que en el análisis del tiempo hasta la progresión tumoral estratificado según el resultado del estudio IHQ, en este caso establecemos dos grupos de pacientes en base a los valores obtenidos por FISH. Se define el grupo de pacientes con valores de ratio FISH menores que 2 (FISH no amplificado) y el grupo de pacientes con valor de ratio FISH mayores o iguales a 2 (FISH amplificado).

Se aplica un modelo de Kaplan Meyer presentando los resultados a continuación.

### Subgrupo FISH amplificado

Cuartiles Estimados			
Percentil	Puntos estimados	Intervalo Confianza 95%	
		[Inferior	Superior)
<b>75</b>	15.9658	11.3338	.
<b>50</b>	7.9829	5.8147	14.5204
<b>25</b>	5.5519	3.4494	7.9829

La mediana del tiempo hasta la progresión es 7.98 meses, IC95% (5.81, 14.52)

### Subgrupo con FISH No amplificado

Cuartiles Estimados			
Percentil	Puntos estimados	Intervalo Confianza 95%	
		[Inferior	Superior)
<b>75</b>	9.5598	8.2786	10.7753
<b>50</b>	5.3548	4.6321	6.6689
<b>25</b>	3.1209	2.5296	4.0736

La

mediana del tiempo hasta la progresión es 5.35 meses, IC95% (4.63,6.67)

Resumen del número de eventos y casos censurados					
Estrato	FISH	Total	Eventos	Censurados	%Censurados
1	AMPLIFICADO	27	20	7	25.93
2	NO AMPLIFICADO	121	114	7	5.79
Total		148	134	14	9.46

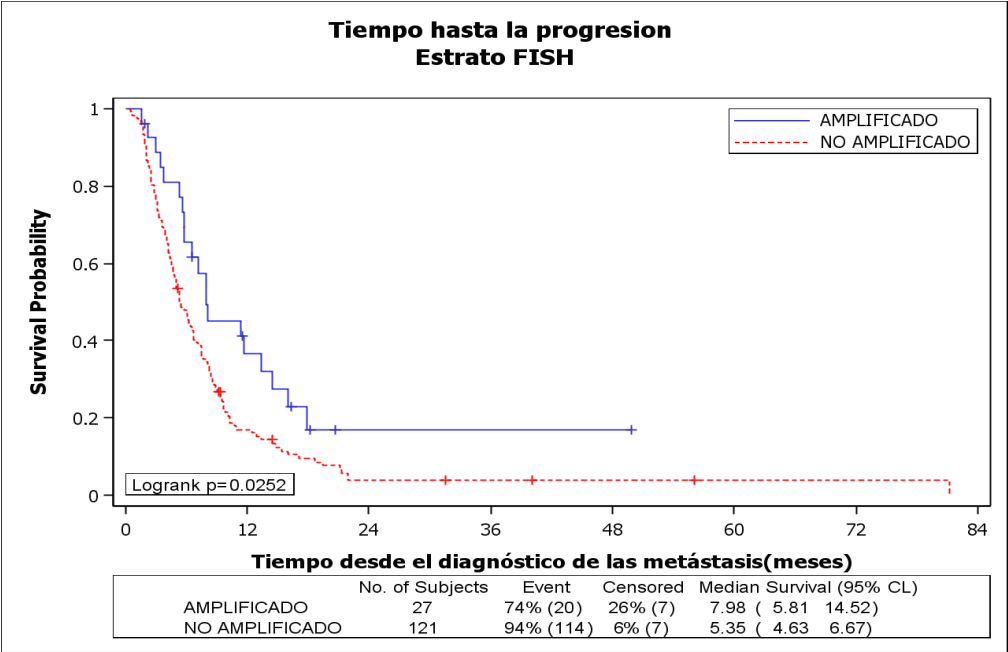
El test de Log Rank ( $p=0.0252$ ) indica que existe una diferencia estadísticamente significativa en el tiempo hasta la progresión, debida al resultado de *HER2* determinado por FISH.

Aplicamos el test de Breslow (ó test de Wilcoxon) y el test de Tarone-Ware con los resultados siguientes:

Test de Igualdad de los estratos			
Test	Chi-cuadrado	DF	Pr >Chi-cuadrado
Log-Rank	5.0067	1	0.0252
Wilcoxon	5.1774	1	0.0229
Tarone	5.3584	1	0.0206

La aplicación del modelo de Cox genera resultados similares: HR (amplificado vs no amplificado): 0.584; IC95% (0.362,0.941);  $p=0.0272$

Estos resultados indican que la amplificación del oncogén *HER2* es un factor protector frente a la progresión tumoral en la población de pacientes metastásicos.



### ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL DE ACUERDO AL RESULTADO FISH

A efectos del análisis de supervivencia, se definen dos grupos de pacientes en base a los valores de FISH. Se define el grupo de pacientes con valores de  $FISH < 2$ , (FISH no amplificado) y el grupo de pacientes con valor de  $FISH \geq 2$  (FISH amplificado). La distribución se resume en la siguiente tabla.

<b>FISH</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>NO AMPLIFICADO (Ratio &lt;2)</b>	121	81.8
<b>AMPLIFICADO (Ratio <math>\geq 2</math>)</b>	27	18.2
<b>Total</b>	148	100.0

Resultados del análisis de supervivencia- Modelo Kaplan Meyer.

#### FISH AMPLIFICADO:

<b>Cuartiles Estimados</b>			
<b>Percentil</b>	<b>Puntos estimados</b>	<b>Intervalo confianza 95%</b>	
		<b>[inferior</b>	<b>superior]</b>
<b>75</b>	25.9527	21.3863	.
<b>50</b>	19.6124	14.5532	25.9527
<b>25</b>	12.9106	3.9750	19.5795

#### FISH NO AMPLIFICADO:

<b>Percentil</b>	<b>Puntos estimados</b>	<b>Intervalo Confianza 95%</b>	
		<b>[inferior</b>	<b>Superior]</b>
<b>75</b>	17.3456	14.0276	22.3719
<b>50</b>	9.7240	7.0959	11.7937
<b>25</b>	4.2050	3.1866	5.9461



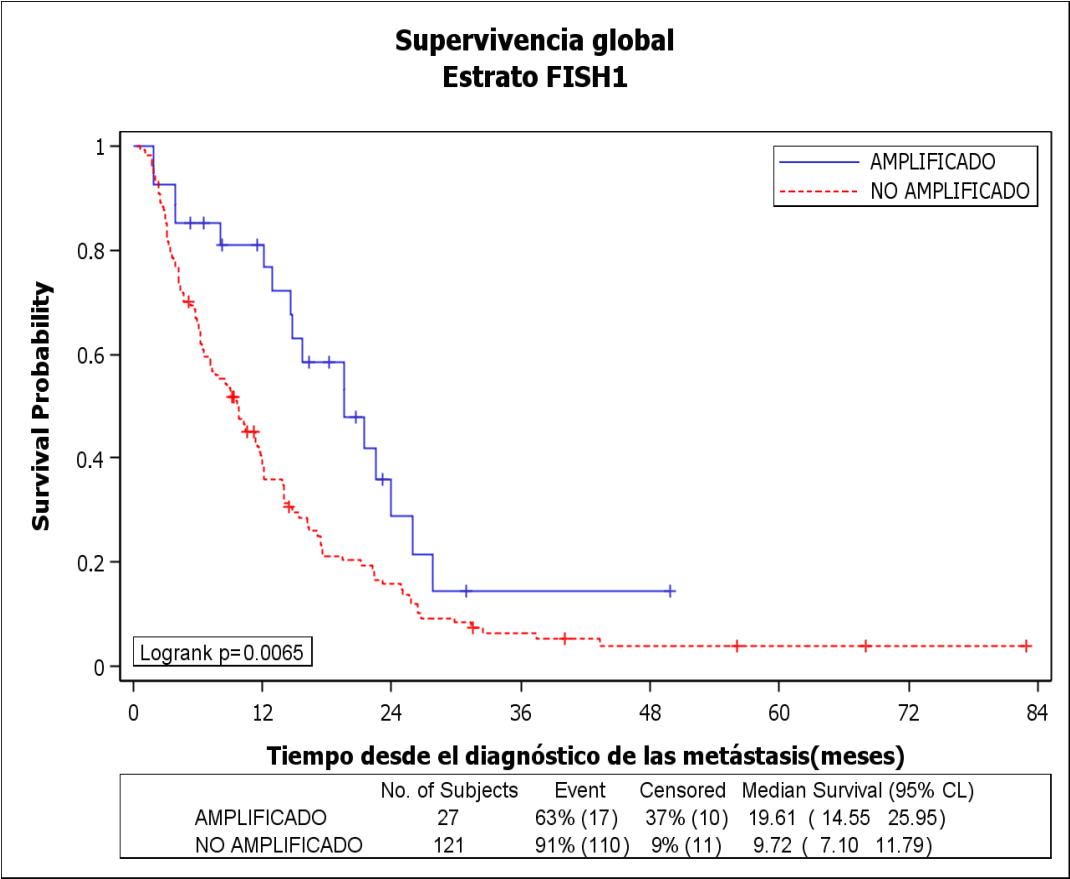
El test de comparación entre los estratos Log-rank, Breslow (ó Wilcoxon), y Tarone-Ware.

Test de igualdad de los estratos			
Test	Chi-cuadrado	DF	Pr > Chi-cuadrado
<b>Log-Rank</b>	7.4111	1	0.0065
<b>Wilcoxon</b>	8.6914	1	0.0032
<b>Tarone</b>	8.8568	1	0.0029

Existe diferencia significativa en la supervivencia global ( $p=0.0065$ ) asociada al valor de *HER2* por FISH, de manera que el grupo de pacientes con amplificación del gen *HER2* presentan mejor supervivencia.

Resumen de resultados y representación gráfica.

Resumen de número de eventos y casos censurados					
Estrato	N	Evento (muerte)	Censurados	Mediana supervivencia	(IC95%)
<b>FISH No amplificado</b>	131	110 (91%)	11(21%)	9.72	(7.10, 11.79)
<b>FISH amplificado</b>	27	17(63%)	10(37%)	19.61	(14.55, 25.95)
<b>Total</b>	148	127	21		



## EFICACIA DEL TRATAMIENTO CON TRASTUZUMAB SEGÚN EL RESULTADO DE FISH

Se realizó un análisis de la posible relación entre la respuesta al tratamiento administrado y el grupo al que pertenece el paciente según el resultado de FISH. Para ello se aplica un test Chi-cuadrado (ó Fisher) con un nivel de significación  $\alpha=0.05$

	<b>Amplificado + Trastuzumab</b>			<b>No amplificado + QT Estándar</b>		
<b>Respuesta</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>
Enfermedad estable	4	28.57	[8.39; 58.10]	18	20.00	[12.31; 29.75]
Respuesta Parcial	5	35.71	[12.76; 64.86]	21	23.33	[15.06; 33.43]
Respuesta Completa	3	21.43	[4.66; 50.80]	10	11.11	[5.46; 19.49]
Progresion Tumoral	2	14.29	[1.78; 42.81]	41	45.56	[35.02; 56.40]

La diferencia en la incidencia de Respuesta Parcial en los grupos Amplificado + Trastuzumab vs No amplificado + QT estándar (35.71% vs 23.33%) no es estadísticamente significativa ( $p=0.3316$ )

La diferencia en la incidencia de Respuesta Completa en los grupos Amplificado+ Trastuzumab vs No amplificado + QT estándar (21.43% vs 11.11%) no es estadísticamente significativa ( $p=0.3771$ )

La tasa de beneficio clínico es mayor de una manera estadísticamente significativa (85.71%) en el grupo de pacientes con FISH Amplificado y que reciben tratamiento con Trastuzumab frente a los pacientes con tumores sin amplificación y que reciben tratamiento QT estándar ( $p=0.0392$ ).

## RESULTADOS DEL ESTUDIO SISH PARA LA DETERMINACIÓN DE *HER2*

A continuación se exponen los resultados detallados de este método.

### POBLACIÓN GLOBAL DE PACIENTES

La distribución de los pacientes según el resultado de SISH es la siguiente:

#### Evaluador 1 Ratio $\geq 2$

SISH	N	%
<b>SISH &lt;2</b>	132	79.5
<b>SISH <math>\geq 2</math></b>	34	20.5
<b>Total</b>	166	100.0

#### Evaluador 2 Ratio $\geq 2$

SISH	N	%
<b>SISH &lt;2</b>	132	79.5
<b>SISH <math>\geq 2</math></b>	34	20.5
<b>Total</b>	166	100.0

#### Evaluador 1 Ratio $\geq 3$

SISH	N	%
<b>SISH &lt;3</b>	138	83.1
<b>SISH <math>\geq 3</math></b>	28	16.9
<b>Total</b>	166	100.0

#### Evaluador 2 Ratio $\geq 3$

SISH	N	%
<b>SISH &lt;3</b>	141	84.9
<b>SISH <math>\geq 3</math></b>	25	15.1
<b>Total</b>	166	100.0

El resumen del análisis descriptivo del parámetro SISH para la población global se resume en la siguiente tabla:

Ratio FISH $\geq 2$	Evaluador 1	Evaluador 2
N	34	34
Media	6,92	5,61
IC95% Media	5,55 – 8,29	4,56 – 6,66
Std	3,922,96	3,00
Mediana	5,66	5,12
Q1	3,6	2,9
Q3	9,78	8,44
Rango intercuartílico	6,18	5,54
Rango (Min – Mmax)	2,06 – 16,70	2,11 – 11,12

## RESULTADOS SISH SEGÚN LA EDAD DE LOS PACIENTES

### Resultados Evaluador 1 Ratio $\geq 2$

		SISH < 2	SISH $\geq 2$	Total
Edad (años)	N	132	34	166
	Media (SD)	65.87(10.20)	66.15(8.63)	65.93(9.87)
	Mediana	68.00	67.50	68.00
	p25% - p75%	60.00 - 73.00	63.00 - 73.00	61.00 - 73.00
	p10% - p90%	51.00 - 77.00	55.00 - 77.00	54.00 - 77.00
	Min - Max	31.00 - 83.00	40.00 - 79.00	31.00 - 83.00

Aplicamos un test no paramétrico de comparación de medias (Wilcoxon-Mann Whitney) entre los grupos con valor de SISH < 2 y SISH  $\geq 2$ .

Test de Wilcoxon	
estadístico	2807.0000
t Approximation	
One-Sided Pr < Z	0.4499
Two-Sided Pr >  Z	0.8998

El resultado indica que no existe diferencia estadísticamente significativa en los valores medios de la edad entre el grupo de pacientes con resultado de SISH < 2 y el grupo de pacientes con resultado SISH  $\geq 2$ .

Calculamos el IC95 de la media de edad, para cada uno de los dos grupos (SISH < 2, SISH  $\geq 2$ ).

SISH (evaluador 1)	N	Media	95% IC	
<b>SISH <math>\geq 2</math></b>	34	66.1471	62.7945	69.4996
<b>SISH &lt; 2</b>	132	65.8712	64.1697	67.5727

#### Evaluador 1 Ratio $\geq 3$ :

		SISH < 3	SISH $\geq 3$	Total
Edad (años)	N	138	28	166
	Media (SD)	66.09(10.06)	65.14(8.98)	65.93(9.87)
	Mediana	68.00	66.00	68.00
	p25% - p75%	61.00 - 73.00	61.50 - 72.50	61.00 - 73.00
	p10% - p90%	51.00 - 77.00	54.00 - 77.00	54.00 - 77.00
	Min - Max	31.00 - 83.00	40.00 - 79.00	31.00 - 83.00

Aplicamos un test no paramétrico de comparación de medias (Wilcoxon-Mann Whitney) entre los grupos con valor SISH < 3 y SISH  $\geq 3$ .

Test de Wilcoxon	
estadístico	2158.0000
t Approximation	
One-Sided Pr < Z	0.2198
Two-Sided Pr >  Z	0.4396

El resultado indica que no existe diferencia estadísticamente significativa en los valores medios de la edad entre el grupo de pacientes con resultado SISH < 3 y el grupo de pacientes con resultado SISH  $\geq$  3.

Calculamos el IC95 de la media de edad, para cada uno de los dos grupos (SISH < 3, SISH  $\geq$  3).

SISH (evaluador 1)	N	Media	95% IC	
SISH <3	138	66.0870	64.4238	67.7501
SISH $\geq$ 3	28	65.1429	61.4506	68.8351

### Evaluador 2 Ratio $\geq$ 2

		SISH<2	SISH $\geq$ 2	Total
Edad (años)	N	132	34	166
	Media (SD)	65.87(10.20)	66.15(8.63)	65.93(9.87)
	Mediana	68.00	67.50	68.00
	p25% - p75%	60.00 - 73.00	63.00 - 73.00	61.00 - 73.00
	p10% - p90%	51.00 - 77.00	55.00 - 77.00	54.00 - 77.00
	Min - Max	31.00 - 83.00	40.00 - 79.00	31.00 - 83.00

Aplicamos un test no paramétrico de comparación de medias (Wilcoxon-Mann Whitney) entre los grupos con valor SISH < 2 y SISH  $\geq$  2.

Test de Wilcoxon	
Estadístico	2807.0000
t Approximation	
One-Sided Pr < Z	0.4499
Two-Sided Pr >  Z	0.8998

El resultado indica que no existe diferencia estadísticamente significativa en los valores medios de la edad entre el grupo de pacientes con resultado SISH < 2 y el grupo de pacientes con resultado SISH  $\geq 2$ .

Calculamos el IC95 de la media de edad, para cada uno de los dos grupos (SISH < 2, SISH  $\geq 2$ ).

SISH (evaluador 2)	N	Media	95% IC	
SISH $\geq 2$	34	66.1471	62.7945	69.4996
SISH < 2	132	65.8712	64.1697	67.5727

### Evaluador 2 Ratio $\geq 3$

		SISH < 3	SISH $\geq 3$	Total
Edad (años)	N	141	25	166
	Media (SD)	66.12(9.98)	64.84(9.37)	65.93(9.87)
	Mediana	68.00	66.00	68.00
	p25% - p75%	61.00 - 73.00	61.00 - 72.00	61.00 - 73.00
	p10% - p90%	54.00 - 77.00	54.00 - 77.00	54.00 - 77.00
	Min - Max	31.00 - 83.00	40.00 - 79.00	31.00 - 83.00

Aplicamos un test no paramétrico de comparación de medias (Wilcoxon-Mann Whitney) entre los grupos con valor SISH < 3 y SISH  $\geq 3$ .



Test de Wilcoxon	
Estadístico	1902.0000
t Approximation	
One-Sided Pr < Z	0.2022
Two-Sided Pr >  Z	0.4043

El resultado indica que no existe diferencia estadísticamente significativa en los valores medios de la edad entre el grupo de pacientes con resultado SISH < 3 y el grupo de pacientes con resultado SISH  $\geq$  3.

Calculamos el IC95 de la media de edad, para cada uno de los dos grupos (SISH < 3, SISH  $\geq$  3).

SISH (evaluador 2)	N	Media	95% IC	
SISH <3	141	66.1206	64.2364	68.0048
SISH $\geq$ 3	25	64.8400	60.3653	69.3147

## RESULTADOS SISH SEGÚN EL SEXO DE LOS PACIENTES

### Evaluador 1 Ratio $\geq 2$

	SISH <2		SISH $\geq 2$		Total	
	N	%	N	%	N	%
Hombre	91	68.94	29	85.29	120	72.29
Mujer	41	31.06	5	14.71	46	27.71
Total	132	100.0	34	100.0	166	100.0

Estadístico	DF	Valor	Prob
Chi-cuadrado	1	3.6100	0.0574

El resultado de la aplicación del test Chi-cuadrado indica que no existe diferencia en la incidencia de SISH  $\geq 2$  debida al sexo.

### Evaluador 1 Ratio $\geq 3$

SISH	SISH <3		SISH $\geq 3$		Total	
	N	%	N	%	N	%
Hombre	97	70.29	23	82.14	120	72.29
Mujer	41	29.71	5	17.86	46	27.71
Total	138	100.0	28	100.0	166	100.0

Estadístico	DF	Valor	Prob
Chi-cuadrado	1	1.6325	0.2014

El resultado de la aplicación del test Chi-cuadrado indica que no existe diferencia en la incidencia de SISH  $\geq 3$  debida al sexo.

**Evaluador 2 Ratio  $\geq 2$** 

	SISH <2		SISH $\geq 2$		Total	
	N	%	N	%	N	%
<b>Hombre</b>	91	68.94	29	85.29	120	72.29
<b>Mujer</b>	41	31.06	5	14.71	46	27.71
<b>Total</b>	132	100.0	34	100.0	166	100.0

Estadístico	DF	Valor	Prob
<b>Chi-cuadrado</b>	1	3.6100	0.0574

El resultado de la aplicación del test Chi-cuadrado indica que no existe diferencia en la incidencia de SISH  $\geq 2$  debida al sexo.

**Evaluador 2 Ratio  $\geq 3$** 

	SISH <3		SISH $\geq 3$		Total	
	N	%	N	%	N	%
<b>Hombre</b>	100	70.92	20	80.00	120	72.29
<b>Mujer</b>	41	29.08	5	20.00	46	27.71
<b>Total</b>	141	100.0	25	100.0	166	100.0

Estadístico	DF	Valor	Prob
<b>Chi-cuadrado</b>	1	0.8736	0.3500

El resultado de la aplicación del test Chi-cuadrado indica que no existe diferencia en la incidencia de SISH  $\geq 3$  debida al sexo.

## RESULTADOS SISH SEGÚN LA PRESENCIA O NO DE METÁSTASIS EN EL DIAGNÓSTICO INICIAL

### Evaluador 1 ratio $\geq 2$

MTS al Dco	SISH <2		SISH $\geq 2$		Total	
	N	%	N	%	N	%
No	63	47.73	12	35.29	75	45.18
Sí	66	50.00	20	58.82	86	51.81
Desconocido	3	2.27	2	5.88	5	3.01
Total	132	100.0	34	100.0	166	100.0

El resultado de la aplicación del test Cochran-Mantel Haenszel indica que no existe asociación estadísticamente significativa entre la existencia de metástasis a distancia en el diagnóstico inicial y la incidencia de amplificación del gen *HER2* determinada por SISH ratio  $\geq 2$ .

Test Cochran-Mantel-Haenszel				
Estadísticos	Hipótesis Alternativa	DF	Valor	Prob
1	Nonzero Correlation	1	2.2743	0.1315
2	Row Mean Scores Differ	1	2.2743	0.1315
3	General Association	2	2.4858	0.2886

### Evaluador 1 Ratio $\geq 3$

MTS al Dco.	SISH <3		SISH $\geq 3$		Total	
	N	%	N	%	N	%
No	66	47.83	9	32.14	75	45.18
Sí	68	49.28	18	64.29	86	51.81
Desconocido	4	2.90	1	3.57	5	3.01
Total	138	100.0	28	100.0	166	100.0

Test Cochran-Mantel-Haenszel				
Estadísticos	Hipótesis alternativa	DF	Valor	Prob
1	Nonzero Correlation	1	2.0353	0.1537
2	Row Mean Scores Differ	1	2.0353	0.1537
3	General Association	2	2.3006	0.3165

El resultado de la aplicación del test Cochran-Mantel-Haenszel indica que no existe asociación estadísticamente significativa entre la presencia de metástasis a distancia en el diagnóstico inicial y la incidencia de amplificación del gen *HER2* determinada por un ratio de SISH  $\geq 3$ .

### Evaluador 2 Ratio $\geq 2$

MTS al Dco	SISH <2		SISH $\geq 2$		Total	
	N	%	N	%	N	%
No	63	47.73	12	35.29	75	45.18
Sí	66	50.00	20	58.82	86	51.81
Desconocido	3	2.27	2	5.88	5	3.01
Total	132	100.0	34	100.0	166	100.0

El resultado de la aplicación del test Cochran-Mantel-Haenszel indica que no existe asociación estadísticamente significativa entre la presencia de metástasis a distancia en el diagnóstico inicial y la incidencia de amplificación del gen *HER2* determinada por un ratio de SISH  $\geq 2$ .

Test Cochran-Mantel-Haenszel				
Estadísticos	Hipótesis Alternativa	DF	Valor	Prob
1	Nonzero Correlation	1	2.2743	0.1315
2	Row Mean Scores Differ	1	2.2743	0.1315
3	General Association	2	2.4858	0.2886

**Evaluador 2 Ratio  $\geq 3$** 

MTS al Dco	SISH <3		SISH $\geq 3$		Total	
	N	%	N	%	N	%
No	66	46.81	9	36.00	75	45.18
Sí	70	49.65	16	64.00	86	51.81
Desconocido	5	3.55	0	0	5	3.01
Total	141	100.0	25	100.0	166	100.0

Test Cochran-Mantel-Haenszel				
Estadísticos	Hipótesis alternativa	DF	Valor	Prob
1	Nonzero Correlation	1	0.3661	0.5452
2	Row Mean Scores Differ	1	0.3661	0.5452
3	General Association	2	2.2664	0.3220

El resultado de la aplicación del test Cochran-Mantel-Haenszel indica que no existe asociación estadísticamente significativa entre la presencia de metástasis a distancia en el diagnóstico inicial y la incidencia de amplificación del gen *HER2* determinada por SISH Ratio  $\geq 3$ .

## POBLACIÓN DE PACIENTES METASTASICOS

## RESULTADOS DE SISH SEGÚN LA LOCALIZACIÓN DE LAS METÁSTASIS

	SISH <2	SISH ≥2	p-value	SISH <3	SISH ≥3	p-value
<b>Metastasis hepáticas</b>						
Evaluador 1	40 (34.48%)	17 (53.13%)	0.0550	43 (35.54%)	14 (51.85%)	0.1152
Evaluador 2	40 (34.48%)	17 (53.13%)	0.0550	45 (36.29%)	12 (50.00%)	0.2065
<b>Mts Pulmonares</b>						
Evaluador 1	10 (8.62%)	7 (21.88%)	0.0564	12 (9.92%)	5 (18.52%)	0.1987
Evaluador 2	10(8.62%)	7 (21.88%)	0.0564	14 (11.29%)	3 (12.50%)	1.0000
<b>Mts Ganglionares torácicas</b>						
Evaluador 1	11 (9.48%)	4 (12.50%)	0.7405	12 (9.92%)	3 (11.11 %)	0.7380
Evaluador 2	11 (9.48%)	4 (12.50%)	0.7405	12 (9.68%)	3 (12.50 %)	0.7119
<b>Mts ganglionares abdominales</b>						
Evaluador 1	67 (57.76%)	23 (71.88%)	0.1476	70 (57.85%)	20 (74.07%)	0.1184
Evaluador 2	67 (57.76%)	23 (71.88%)	0.1476	70 (57.85%)	20 (74.07%)	0.1184
<b>Carcinomatosis peritoneal</b>						
Evaluador 1	43 (37.07%)	5 (15.63%)	0.0218	43 (35.54 %)	5 (18.52%)	0.0876
Evaluador 2	43 (37.07%)	5 (15.63%)	0.0218	43 (34.68 %)	5 (20.83 %)	0.1848
<b>Mts Ovaricas</b>						
Evaluador 1	5 (4.31%)	0 (0%)	0.5854	5 (4.13%)	0 (0%)	0.5850
Evaluador 2	5 (4.31%)	0 (0%)	0.5854	5 (4.03%)	0 (0%)	1.0000
<b>Mts óseas</b>						
Evaluador 1	8 (6.90%)	0 (0%)	0.2018	8 (6.61%)	0 (0%)	0.3516
Evaluador 2	8 (6.90%)	0 (0%)	0.2018	8 (6.45%)	0 (0%)	0.3547
<b>Mts en SNC</b>						
Evaluador 1	1 (0.86%)	0 (0%)	1.0000	1 (0.83%)	0 (0%)	1.0000
Evaluador 2	1 (0.86%)	0 (0%)	1.0000	1 (0.81%)	0 (0%)	1.0000

Tabla 11 Resultados de SISH según la localización metastásica

En ningún caso, salvo en los de carcinomatosis peritoneal, se objetivaron diferencias estadísticamente significativas en la incidencia de amplificación del gen *HER2*.

En los casos de carcinomatosis peritoneal se encontró una incidencia menor de casos amplificados si se utilizaba el ratio  $\geq 2$  como punto de corte. Esta diferencia estadística perdía su significación para los 2 evaluadores si el ratio empleado era  $\geq 3$ .



## ANÁLISIS DEL TIEMPO HASTA LA PROGRESIÓN TUMORAL

Se definen dos grupos de pacientes en base a los valores de SISH. Se define el grupo de pacientes con ratio de SISH menor que 2 (SISH no amplificado) y el grupo de pacientes con ratio de SISH mayor o igual a 2 (SISH amplificado). Posteriormente realizamos el mismo análisis considerando el grupo amplificado con ratio de SISH  $\geq 3$ .

Se aplica un modelo de Kaplan Meyer presentando los resultados a continuación para cada evaluador.

## Evaluador 1 ratio $\geq 2$

En el **subgrupo con SISH amplificado** los resultados son

Cuartiles Estimados			
Percentil	Puntos estimados	Intervalo Confianza 95%	
		[inferior]	Superior]
75	15.9658	8.0815	.
50	7.9829	5.7819	13.3377
25	3.8108	2.5296	7.1616

La mediana del tiempo hasta la progresión es 7.98 meses, IC95% (5.78, 13.34)

En el **subgrupo con SISH No amplificado** los resultados son

Cuartiles Estimados			
Percentil	Puntos estimados	Intervalo confianza 95%	
		[inferior]	Superior]
75	9.5598	8.2786	10.7753
50	5.3548	4.6649	6.7017
25	3.1866	2.5624	4.0736

La mediana del tiempo hasta la progresión es 5.35 meses, IC95% (4.66, 6.70)

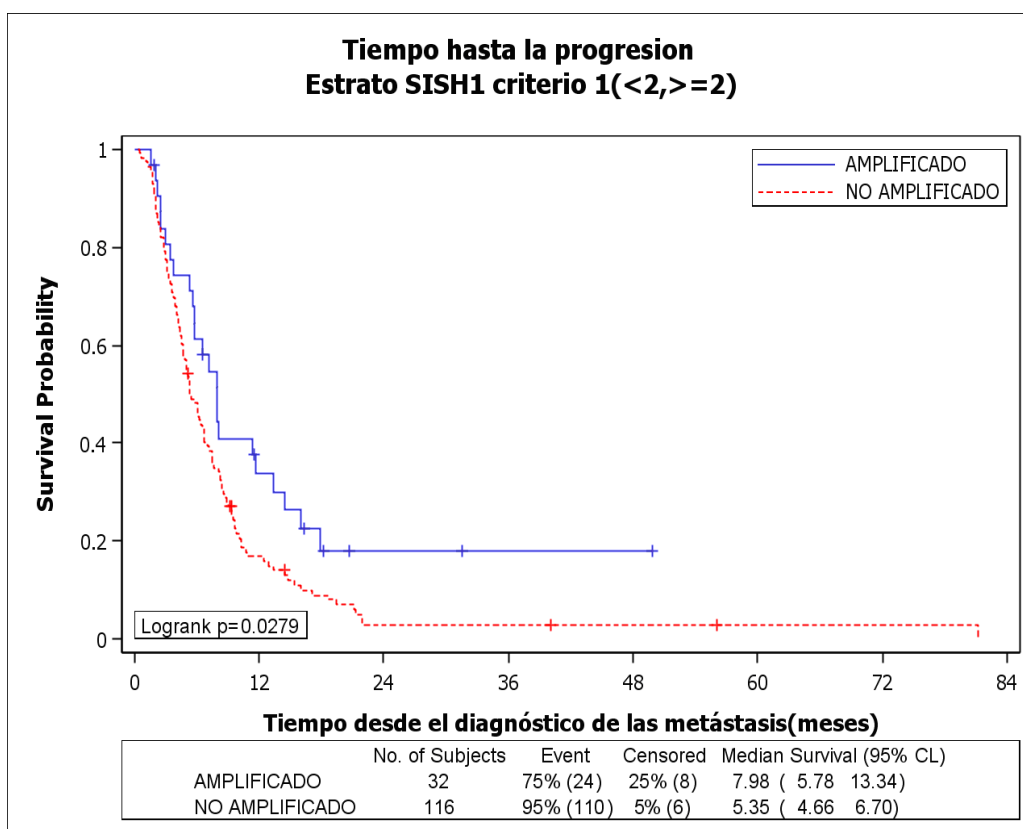
Resumen del número de eventos y valores censurados					
Estrato	SISH	Total	Eventos	Censurados	%Censurados
1	AMPLIFICADO	32	24	8	25.00
2	NO AMPLIFICADO	116	110	6	5.17
Total		148	134	14	9.46

El test de Log Rank ( $p=0.0279$ ) indica que existe una diferencia estadísticamente significativa en el tiempo hasta la progresión, debida al resultado SISH.

También aplicamos el test de Breslow (ó test de Wilcoxon) y el test de Tarone-Ware con los resultados siguientes:

Test de igualdad de los estratos			
Test	Chi-cuadrado	DF	Pr > Chi-cuadrado
<b>Log-Rank</b>	4.8328	1	0.0279
<b>Wilcoxon</b>	3.3072	1	0.0690
<b>Tarone</b>	4.0443	1	0.0443

La aplicación del modelo de Cox genera similares resultados: HR (amplificado vs No amplificado): 0.611; IC95% (0.392,0.953); p=0.0297



### Evaluador 1 Ratio $\geq 3$

En el **subgrupo con SISH amplificado** los resultados son

Cuartiles Estimados			
Percentil	Puntos estimados	Interval confianza 95%	
		[inferior	Superior]
<b>75</b>	15.9658	11.3338	.
<b>50</b>	7.9829	5.8147	14.5204
<b>25</b>	5.5519	3.4494	7.9829

La mediana del tiempo hasta la progresión es 7.98 meses, IC95% (5.81, 14.52)

En el **subgrupo con SISH No amplificado** los resultados son

Cuartiles estimados			
Percentil	Puntos estimados	Intevalo confianza 95%	
		[inferior	Superior]
<b>75</b>	9.5598	8.2786	10.7753
<b>50</b>	5.3548	4.6321	6.6689
<b>25</b>	3.1209	2.5296	4.0736

La mediana del tiempo hasta la progresión es 5.35 meses, IC95% (4.63, 6.67)

Resumen del número de eventos y casos censurados					
Estratos	SISH	Total	eventos	Censurados	%Censurados
<b>1</b>	AMPLIFICADO	27	20	7	25.93
<b>2</b>	NO AMPLIFICADO	121	114	7	5.79
<b>Total</b>		148	134	14	9.46

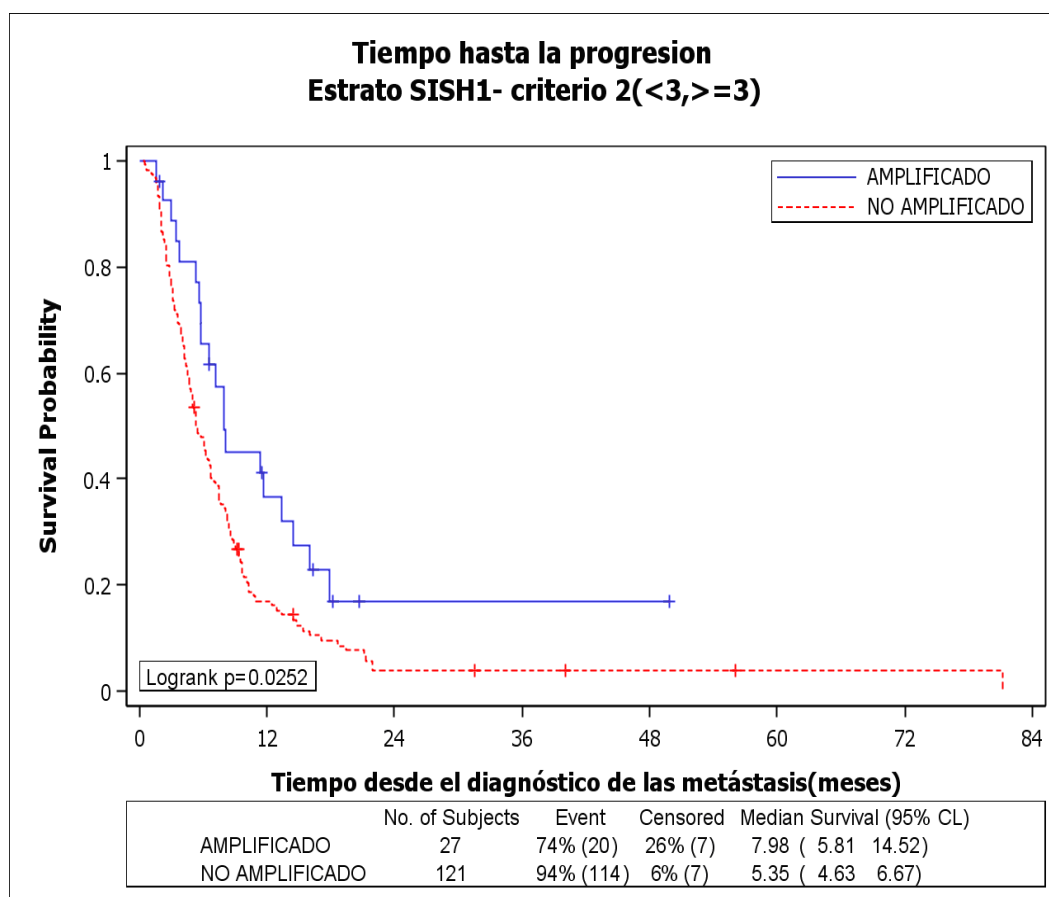
El test de Log Rank ( $p=0.0252$ ) indica que existe una diferencia estadísticamente significativa en el tiempo hasta la progresión, debida al resultado SISH.

También aplicamos el test de Breslow (ó test de Wilcoxon) y el test de Tarone-Ware con los resultados siguientes:

Test de Igualdad de los estratos			
Test	Chi-cuadrado	DF	Pr > Chi-cuadrado
Log-Rank	5.0067	1	0.0252
Wilcoxon	5.1774	1	0.0229
Tarone	5.3584	1	0.0206

La aplicación del modelo de Cox genera similares resultados: HR (amplificado vs No amplificado): 0.584; IC95% (0.362, 0.941);  $p=0.0272$

Resultado gráfico



## Evaluador 2 Ratio $\geq 2$

En el **subgrupo con SISH amplificado** los resultados son

Quartile Estimates			
Percent	Point Estimate	95% Confidence Interval	
		[Lower	Upper)
75	15.9658	8.0815	.
50	7.9829	5.7819	13.3377
25	3.8108	2.5296	7.1616

La mediana del tiempo hasta la progresión es 7.98 meses, IC95% (5.78, 13.34)

En el **subgrupo con SISH No amplificado** los resultados son

Quartile Estimates			
Percent	Point Estimate	95% Confidence Interval	
		[Lower	Upper)
75	9.5598	8.2786	10.7753
50	5.3548	4.6649	6.7017
25	3.1866	2.5624	4.0736

La mediana del tiempo hasta la progresión es 5.35 meses, IC95% (4.66, 6.70).

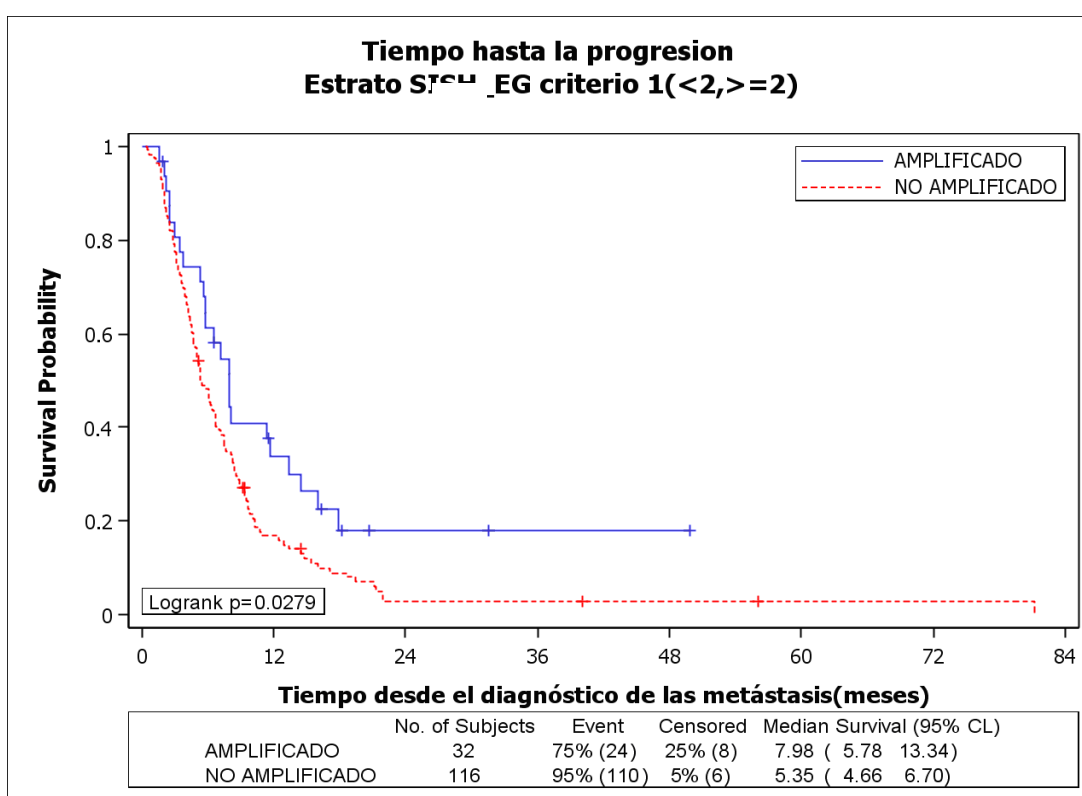
Summary of the Number of Censored and Uncensored Values					
Stratum	SISH	Total	Failed	Censored	%Censored
1	AMPLIFICADO	32	24	8	25.00
2	NO AMPLIFICADO	116	110	6	5.17
Total		148	134	14	9.46

El test de Log Rank ( $p=0.0279$ ) indica que existe una diferencia estadísticamente significativa en el tiempo hasta la progresión, debida al resultado SISH.

También aplicamos el test de Breslow (ó test de Wilcoxon) y el test de Tarone-Ware con los resultados siguientes:

Equality over Strata			
Test	Chi-Square	DF	Pr > Chi-Square
Log-Rank	4.8328	1	0.0279
Wilcoxon	3.3072	1	0.0690
Tarone	4.0443	1	0.0443

La aplicación del modelo de Cox genera similares resultados: HR (amplificado vs No amplificado): 0.611; IC95% (0.392, 0.953); p=0.0297



## Evaluador 2 Ratio $\geq 3$

En el **subgrupo con SISH amplificado** los resultados son

Cuartiles Estimados			
Percentil	Puntos estimados	Intervalo confianza 95%	
		[inferior	Superior]
<b>75</b>	14.5204	8.0815	.
<b>50</b>	7.9829	5.7819	13.3377
<b>25</b>	5.5519	3.0223	7.1616

La mediana del tiempo hasta la progresión es 7.98 meses, IC95% (5.78, 13.34).

En el **subgrupo con SISH No amplificado** los resultados son

Cuartiles estimados			
Percentil	Puntos estimados	Interval confianza 95%	
		[inferior	Uperior]
<b>75</b>	9.6583	8.2786	10.9067
<b>50</b>	5.4534	4.6649	6.7017
<b>25</b>	3.1209	2.5624	4.0736

La mediana del tiempo hasta la progresión es 5.45 meses, IC95% (4.66, 6.70).

Resumen del número de eventos y casos censurados.					
Estrato	SISH	Total	evento	Censurados	%Censurados
<b>1</b>	AMPLIFICADO	25	19	6	24.00
<b>2</b>	NO AMPLIFICADO	123	115	8	6.50
<b>Total</b>		148	134	14	9.46

El test de Log Rank ( $p=0.0527$ ) indica que no existe una diferencia estadísticamente significativa en el tiempo hasta la progresión, debida al resultado SISH.

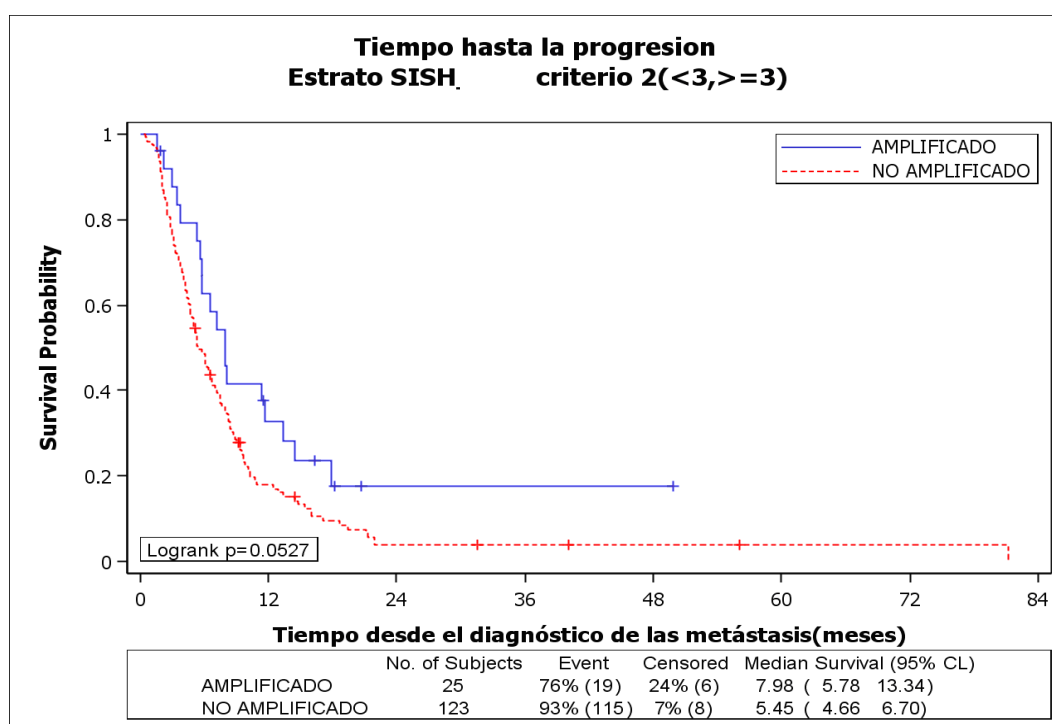


También aplicamos el test de Breslow (ó test de Wilcoxon) y el test de Tarone-Ware con los resultados siguientes:

Test de igualdad de los estratos			
Test	Chi-cuadrado	DF	Pr > Chi-cuadrado
Log-Rank	3.7528	1	0.0527
Wilcoxon	3.5823	1	0.0584
Tarone	3.7654	1	0.0523

La aplicación del modelo de Cox genera similares resultados:

HR (amplificado vs No amplificado): 0.621; IC95% (0.381, 1.011); p=0.0553



Estos resultados indican que la amplificación del oncogén *HER2* determinada por SISH es un factor protector frente a la progresión tumoral, tanto en los casos que se consideran amplificados con ratio  $\geq 2$  como en aquellos en los que se eleva este punto de corte hasta un ratio  $\geq 3$ .

## ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL DE ACUERDO AL RESULTADO SISH

Al igual que lo realizado para el análisis del tiempo hasta la progresión tumoral, para analizar la supervivencia global de los pacientes se detallan, de manera independiente, los resultados de dos evaluadores y con dos puntos de corte distintos para considerar el resultado como amplificado: Ratio *HER2*/CEP 17  $\geq 2$  y  $\geq 3$ .

**Evaluador 1 Ratio  $\geq 2$** 

Resultados del análisis de supervivencia- Modelo Kaplan Meyer

**SISH AMPLIFICADO:**

Cuartiles estimados			
Percentil	Puntos estimados	Interval confianza 95%	
		[inferior	Superior]
<b>75</b>	25.9527	19.6124	.
<b>50</b>	19.5795	12.9106	23.8830
<b>25</b>	9.7240	3.9422	14.8160

**SISH NO AMPLIFICADO:**

Cuartiles estimados			
Percentil	Puntos estimados	Interval confianza 95%	
		[Lower	Upper)
<b>75</b>	17.3456	14.0276	22.3719
<b>50</b>	9.6583	7.0959	11.7937
<b>25</b>	4.2378	3.1866	5.9461

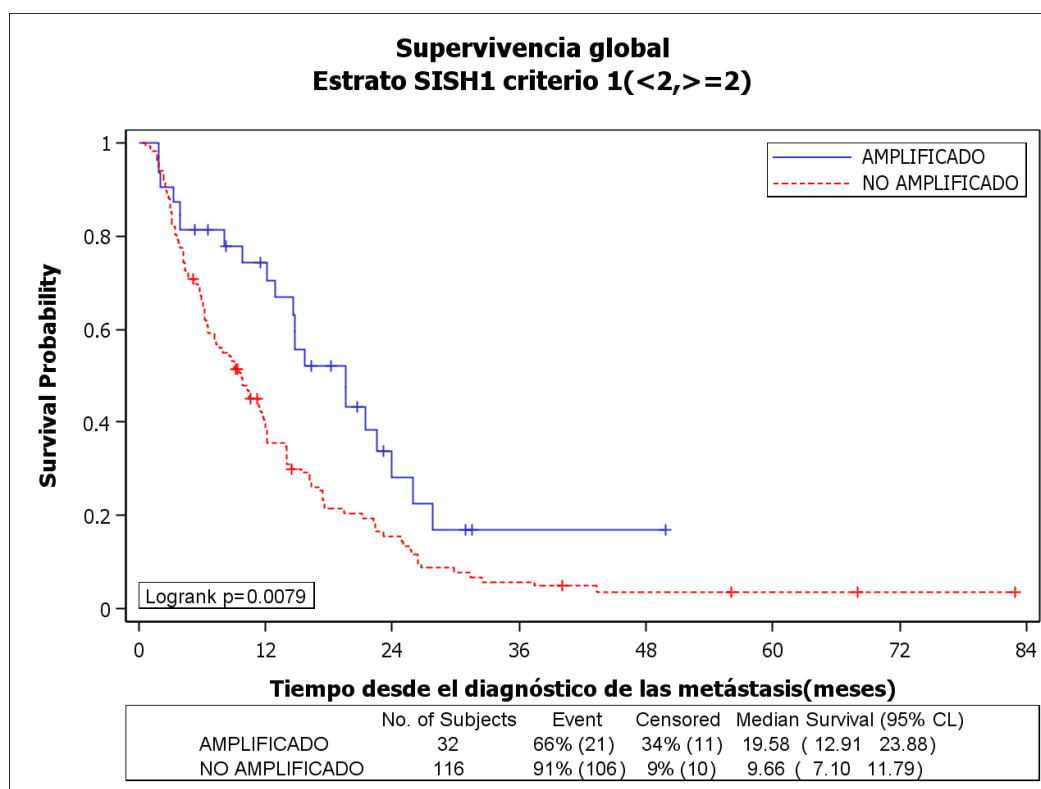
Test de comparación entre los estratos Log-rank, Breslow (ó Wilcoxon), y Tarone-Ware.

Test de comparación entre estratos			
Test	Chi-cuadrado	DF	Pr > Chi-cuadrado
<b>Log-Rank</b>	7.0510	1	0.0079
<b>Wilcoxon</b>	6.9794	1	0.0082
<b>Tarone</b>	7.5850	1	0.0059

Existe diferencia significativa en la supervivencia global ( $p=0.0079$ ) asociada al valor de SISH.

Tabla Resumen modelo Kaplan –Meyer

Resumen del número de eventos y casos censurados					
Estrato	Nº sujetos	Evento (muerte)	Censurados	Mediana supervivencia	(IC95%)
SISH amplificado	32	21 (66%)	11(34%)	19.58	(12.91, 23.88)
SISH No amplificado	116	106 (91%)	10 (9%)	9.66	(7.10, 11.79)
<b>Total</b>	<b>128</b>	<b>127</b>	<b>21</b>		



Resultado del modelo de Cox:

Hazard ratio: 0.535; IC95% (0.334, 0.856); P-value: 0.0090

**Evaluador 1 Ratio  $\geq 3$** **SISH AMPLIFICADO**

<b>Cuartiles estimados</b>			
<b>Percentil</b>	<b>Puntos estimados</b>	<b>Intervalo confianza 95%</b>	
		<b>[inferior]</b>	<b>Superior]</b>
<b>75</b>	25.9527	19.6124	.
<b>50</b>	19.6124	14.5532	25.9527
<b>25</b>	12.9106	3.9750	19.5795

**SISH NO AMPLIFICADO**

<b>Cuartiles estimados</b>			
<b>Percentil</b>	<b>Puntos estimados</b>	<b>Intervalo confianza 95%</b>	
		<b>[inferior]</b>	<b>Superior]</b>
<b>75</b>	17.3456	14.0276	22.3719
<b>50</b>	9.7240	7.0959	11.7937
<b>25</b>	4.2050	3.1866	5.9461

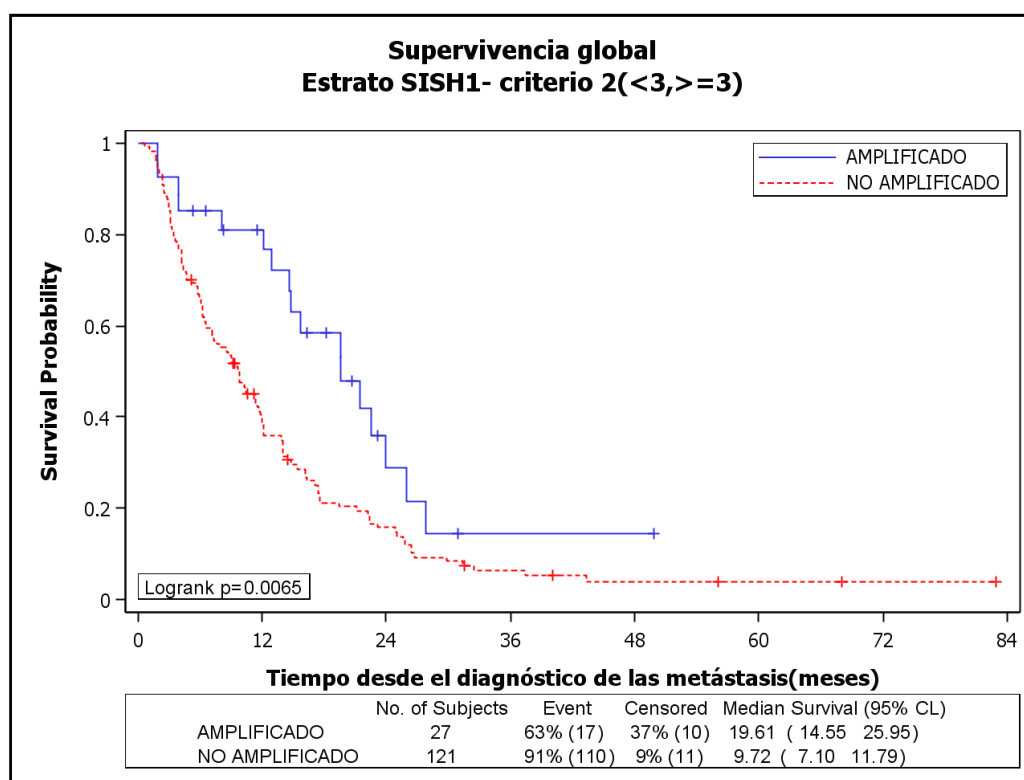
Test de comparación entre los estratos (Log-rank, Breslow (ó Wilcoxon), Tarone-Ware )

<b>Test de comparacion entre estratos</b>			
<b>Test</b>	<b>Chi-Square</b>	<b>DF</b>	<b>Pr&gt; Chi-Square</b>
<b>Log-Rank</b>	7.4111	1	0.0065
<b>Wilcoxon</b>	8.6914	1	0.0032
<b>Tarone</b>	8.8568	1	0.0029

Existe diferencia significativa en la supervivencia global ( $p=0.0065$ ) asociada al valor de SISH.

Tabla Resumen modelo Kaplan –Meyer

Resumen del número de eventos y casos censurados					
Estrato	Nº sujetos	Evento (muerte)	Censurados	Mediana supervivencia	(IC95%)
SISH amplificado	26	16 (62%)	10 (38%)	19.61	(14.55, 25.95)
SISH No amplificado	122	111 (91%)	11 (9%)	9.72	(7.10, 11.79)
<b>Total</b>	<b>148</b>	<b>127</b>	<b>21</b>		



Resultado del modelo de Cox:

Hazard ratio: 0.498; IC95% (0.298, 0.831); P-value: 0.0077

**Evaluador 2 ratio  $\geq 2$** 

Resultados del análisis de supervivencia- Modelo Kaplan Meyer

**SISH AMPLIFICADO:**

Cuartiles estimados			
Percentil	Puntos estimados	Intervalo confianza 95%	
		[inferior	Superior]
<b>75</b>	25.9527	19.6124	.
<b>50</b>	19.5795	12.9106	23.8830
<b>25</b>	9.7240	3.9422	14.8160

**SISH NO AMPLIFICADO:**

Cuartiles estimados			
Percentil	Puntos estimados	Intervalo confianza 95%	
		[inferior	Superior]
<b>75</b>	17.3456	14.0276	22.3719
<b>50</b>	9.6583	7.0959	11.7937
<b>25</b>	4.2378	3.1866	5.9461

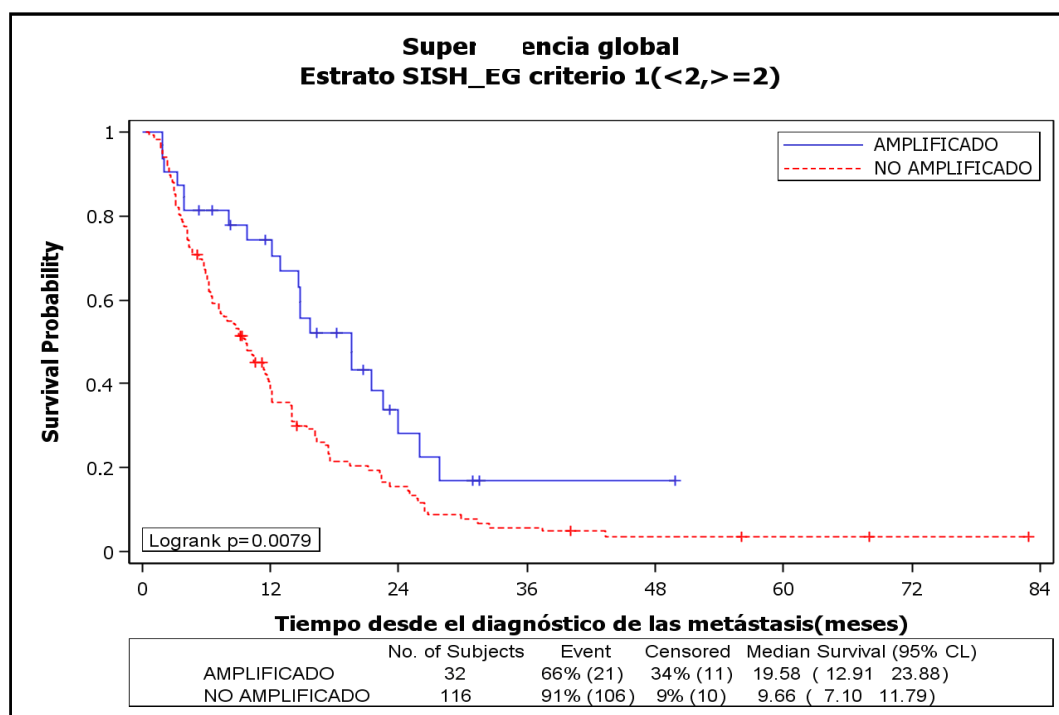
Test de comparación entre los estratos (Log-Rank, Breslow (ó Wilcoxon), Tarone-Ware )

Test de comparación entre estratos			
Test	Chi-cuadrado	DF	Pr > Chi-cuadrado
<b>Log-Rank</b>	7.0510	1	0.0079
<b>Wilcoxon</b>	6.9794	1	0.0082
<b>Tarone</b>	7.5850	1	0.0059

Existe diferencia significativa en la supervivencia global ( $p=0.0079$ ) asociada al valor de SISH.

Tabla Resumen modelo Kaplan –Meyer

Resumen del número de eventos y caos censurados					
Estrato	Nº sujetos	Evento (muerte)	Censurados	Mediana supervivencia	(IC95%)
SISH amplificado	32	21 (66%)	11(34%)	19.58	(12.91, 23.88)
SISH No amplificado	116	106 (91%)	10 (9%)	9.66	(7.10, 11.79)
<b>Total</b>	<b>148</b>	<b>127</b>	<b>21</b>		



Resultado del modelo de Cox:

Hazard ratio: 0.535; IC95% (0.334, 0.856); P-value: 0.0090



**Evaluador 2 Ratio  $\geq 3$** 

Resultados del análisis de supervivencia- Modelo Kaplan Meyer

**SISH AMPLIFICADO:**

Cuartiles estimados			
Percentil	Puntos estimados	Intervalo confianza 95%	
		[inferior	Superior]
<b>75</b>	25.9527	19.6124	.
<b>50</b>	19.6124	14.5532	23.8830
<b>25</b>	12.9106	3.9750	19.5795

**SISH NO AMPLIFICADO:**

Cuartiles estimados			
Percentil	Puntos estimados	Intervalo confianza 95%	
		[inferior	Superior]
<b>75</b>	17.3456	14.0604	22.4376
<b>50</b>	9.7240	7.1945	11.9251
<b>25</b>	4.2050	3.3509	5.9461

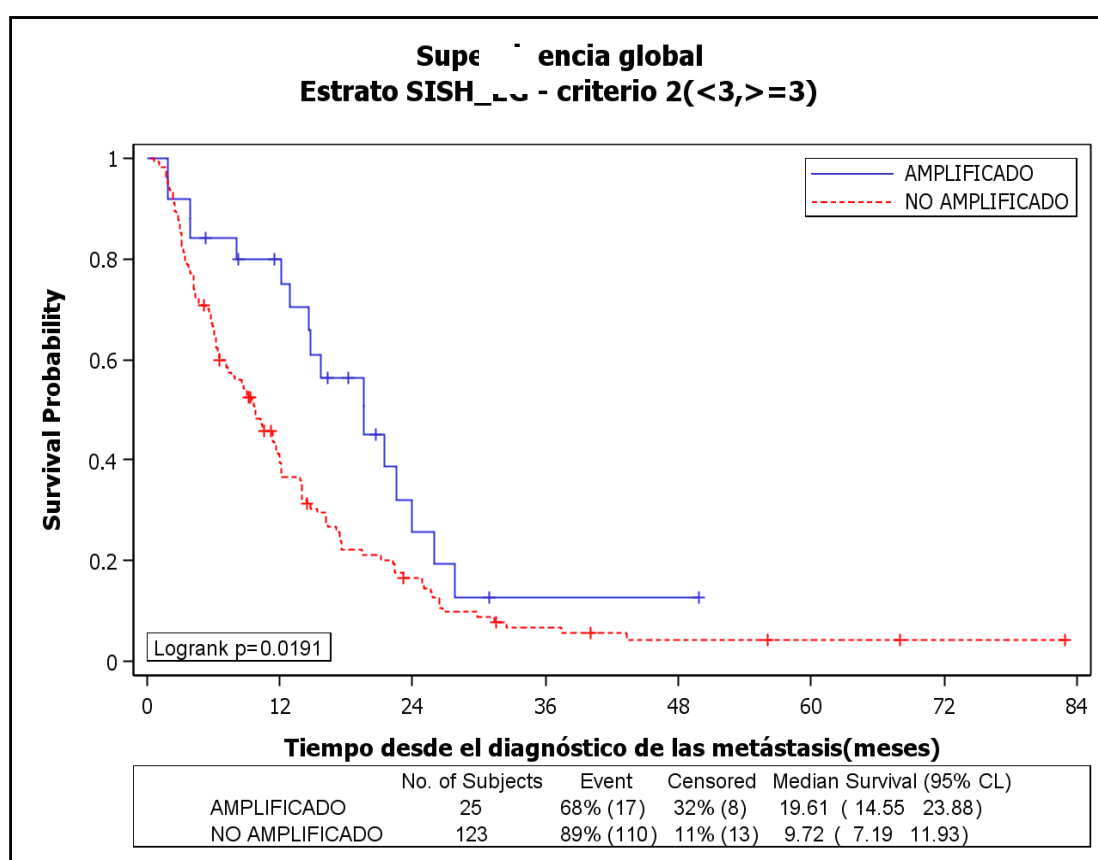
Test de comparación entre los estratos (Log-Rank, Breslow (ó Wilcoxon), Tarone-Ware )

Test de comparación entre estratos			
Test	Chi-cuadrado	DF	Pr > Chi-cuadrado
<b>Log-Rank</b>	5.4890	1	0.0191
<b>Wilcoxon</b>	6.8737	1	0.0087
<b>Tarone</b>	6.8465	1	0.0089

Existe diferencia significativa en la supervivencia global ( $p=0.0191$ ) asociada al valor de SISH, siendo mayor la supervivencia en los casos amplificados.

Tabla Resumen modelo Kaplan –Meyer

Resumen del número de eventos y casos censurados					
Estrato	Nº sujetos	Evento (muerte)	Censurados	Mediana supervivencia	(IC95%)
SISH amplificado	24	16(67%)	8(33%)	19.61	(14.55, 23.88)
SISH No amplificado	124	111(90%)	13(10%)	9.72	(7.19, 11.93)
<b>Total</b>	<b>148</b>	<b>127</b>	<b>21</b>		



Resultado del modelo de Cox:

Hazard ratio: 0.511; IC95% (0.302, 0.865)P-value: 0.0124

## EFICACIA DEL TRATAMIENTO CON TRASTUZUMAB SEGÚN EL RESULTADO DE SISH

Se realizó un análisis de la asociación entre la respuesta al tratamiento administrado y el grupo al que pertenece el paciente de acuerdo con el estado de *HER2* determinado por el método de SISH. Se presentan los resultados detallados para cada uno de los dos evaluadores y con los dos ratios diferentes empleados para considerar los casos positivos ( $\geq 2$  y  $\geq 3$ )

### Método SISH Evaluador 1 ratio $\geq 2$

	Amplificado + Trastuzumab			No amplificado + QT Estándar		
Respuesta	N	%	IC 95%	N	%	IC 95%
Enfermedad Estable	4	26.67	[7.79; 55.10]	18	20.69	[12.75; 30.71]
Respuesta Parcial	5	33.33	[11.82; 61.62]	21	24.14	[15.60; 34.50]
Respuesta Completa	3	20.00	[4.33; 48.09]	9	10.34	[4.84; 18.73]
Progresion Tumoral	3	20.00	[4.33; 48.09]	39	44.83	[34.15; 55.87]

La incidencia de Respuesta Parcial en los grupos Amplificado+ Trastuzumab vs No amplificado + QT estándar (33.33% vs 24.14%) no es distinta de manera estadísticamente significativa ( $p=0.5233$ ).

La incidencia de Respuesta Completa en los grupos Amplificado+ Trastuzumab vs No amplificado + QT estándar (20.00% vs 10.34 %) no es distinta de manera estadísticamente significativa ( $p=0.3781$ ).

Existe un mayor beneficio clínico (80.00%) en el grupo Amplificado + Trastuzumab que en el grupo No amplificado + QT estándar (5,17%), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.0621$ ).

**Método SISH Evaluador 1 Ratio  $\geq 3$** 

	<b>Amplificado + Trastuzumab</b>			<b>No amplificado + QT Estándar</b>		
<b>Respuesta</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>
Enfermedad estable	4	28.57	[8.39; 58.10]	18	20.00	[12.31; 29.75]
Respuesta Parcial	5	35.71	[12.76; 64.86]	21	23.33	[15.06; 33.43]
Respuesta Completa	3	21.43	[4.66; 50.80]	10	11.11	[5.46; 19.49]
Progresión Tumoral	2	14.29	[1.78; 42.81]	41	45.56	[35.02; 56.40]

La incidencia de Respuesta Parcial en los grupos Amplificado+ Trastuzumab vs No amplificado + QT estándar (35.71% vs 23.33%) no es diferente de manera estadísticamente significativa ( $p=0.3316$ ).

La incidencia de Respuesta Completa en los grupos Amplificado+ Trastuzumab vs No amplificado + QT estándar (21.43% vs 11.11 %) no es distinta de modo estadísticamente significativo ( $p=0.3771$ ).

Existe un mayor beneficio clínico (85.71%) en el grupo Amplificado + Trastuzumab que en el grupo No amplificado + QT estándar (54.44%). Esta diferencia es estadísticamente significativa ( $p=0.0392$ ).

## Método SISH Evaluador 2 Ratio $\geq 2$

	Amplificado + Trastuzumab			No amplificado+ QT Estándar		
Respuesta	N	%	IC 95%	N	%	IC 95%
Enfermedad estable	4	26.67	[7.79; 55.10]	18	20.69	[12.75; 30.71]
Respuesta Parcial	5	33.33	[11.82; 61.62]	21	24.14	[15.60; 34.50]
Respuesta Completa	3	20.00	[4.33; 48.09]	9	10.34	[4.84; 18.73]
Progresion Tumoral	3	20.00	[4.33; 48.09]	39	44.83	[34.15; 55.87]

La incidencia de Respuesta Parcial en los grupos Amplificado+ Trastuzumab vs No amplificado + QT estándar (33.33% vs 24.14%) no es significativamente distinta ( $p=0.5233$ ).

La incidencia de Respuesta Completa en los grupos Amplificado+ Trastuzumab vs No amplificado + QT estándar (20.00% vs 10.34 %) no es distinta de manera estadísticamente significativa ( $p=0.3781$ ).

Existe un mayor beneficio clínico en el grupo Amplificado + Trastuzumab (80.00%) vs el grupo No amplificado + QT estándar (55.17%) ( $p=0.0621$ ). Esta diferencia resulta estadísticamente significativa.

**Método SISH Evaluador 2 Ratio  $\geq 3$** 

	<b>Amplificado +Trastuzumab</b>			<b>No amplificado + QT Estándar</b>		
<b>Respuesta</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>
Enfermedad Estable	3	23.08	[5.04; 53.81]	19	20.65	[12.92; 30.36]
Respuesta Parcial	5	38.46	[13.86; 68.42]	22	23.91	[15.63; 33.94]
Respuesta Completa	3	23.08	[5.04; 53.81]	10	10.87	[5.34; 19.08]
Progresion Tumoral	2	15.38	[1.92; 45.45]	41	44.57	[34.19; 55.30]

La incidencia de Respuesta Parcial en los grupos Amplificado + Trastuzumab vs No amplificado + QT estándar (38.46% vs 23.91%) es no significativamente distinta ( $p=0.3116$ ).

La incidencia de Respuesta Completa en los grupos Amplificado + Trastuzumab vs No amplificado + QT estándar (23.08% vs 10.87 %) es no significativamente distinta ( $p=0.2019$ ).

Existe un beneficio clínico (84.62%) en el grupo Amplificado + Trastuzumab vs 55.43 % en el grupo No amplificado + QT estándar ( $p=0.0402$ ).

## ANALISIS DE CORRELACION Y CONSISTENCIA DE RESULTADOS ENTRE LOS DISTINTOS METODOS DE DETERMINACION DE LA AMPLIFICACION DE *HER2*

### PARA LA POBLACION GLOBAL

Calculamos el coeficiente Alpha de Cronbach, para comprobar la consistencia interna de los resultados de *HER2*, obtenidas aplicando las técnicas de SISH y FISH. El resultado obtenido es el siguiente:

Coeficiente de Cronbach Alpha	
Variables	Alpha
directo	0.968256
estandarizada	0.976527

El valor 0.976527 indica una consistencia excelente entre las distintas medidas obtenidas con las técnicas SISH (2 evaluadores) y FISH.

Aplicamos un análisis de correlación, obteniendo el coeficiente de correlación de Pearson cuyos resultados se muestran a continuación.

Coeficiente de correlacion de Pearson N=166 Prob>  r  underH0:Rho=0			
	RATIO_FISH	RATIO_SISH EVALUADOR 1	RATIO_SISH EVALUADOR 2
RATIO_FISH	1.00000	0.91392 <.0001	0.91579 <.0001
RATIO_SISH EVALUADOR 1	0.91392 <.0001	1.00000	0.96851 <.0001
RATIO_SISH EVALUADOR 2	0.91579 <.0001	0.96851 <.0001	1.00000

El coeficiente de correlación de Pearson es superior a 0.90 con  $p < 0.0001$  lo cual indica una correlación muy alta y estadísticamente significativa entre las

medidas de expresión de HER2 obtenidas con las técnicas SISH (con Ratio  $\geq 2$  por los dos evaluadores) y FISH.

Calculamos el coeficiente de correlación intraclase para estimar la fiabilidad de las medidas. El resultado es 0.96956, lo cual indica una fiabilidad de los resultados alta.



## PARA LA SUBPOBLACION DE PACIENTES METASTASICOS

Se realizó un análisis idéntico para la sub-población de pacientes metastásicos.

Calculamos el coeficiente Alpha de Cronbach;

Coeficiente de Cronbach Alpha	
Variables	Alpha
Directo	0.965288
Estandarizada	0.973736

El valor 0.973736 indica una consistencia excelente entre las distintas medidas obtenidas con las técnicas SISH (2 evaluadores) y FISH.

Aplicamos un análisis de correlación, obteniendo el coeficiente de correlación de Pearson cuyos resultados se muestran a continuación.

Coeficiente de correlacion de Pearson,,N=148 Prob>   r   underH0:Rho=0			
	RATIO_FISH	RATIO_SISH EVALUADOR 1	RATIO_SISH EVALUADOR 2
RATIO_FISH	1.00000	0.90416 <.0001	0.90648 <.0001
RATIO_SISH EVALUADOR 1	0.90416 <.0001	1.00000	0.96495 <.0001
RATIO_SISH EVALUADOR 2	0.90648 <.0001	0.96495 <.0001	1.00000

El coeficiente de correlación de Pearson es superior a 0.90 con  $p < 0.0001$  lo cual indica una correlación muy alta y estadísticamente significativa entre los resultados de HER2 obtenidos con las técnicas de SISH (ratio  $\geq 2$  para los dos evaluadores) y FISH.

Calculamos el coeficiente de correlación intraclase para estimar la fiabilidad de las medidas. El resultado es 0.96972, lo cual indica una fiabilidad de los resultados alta.

Se realizó también el análisis de correlación entre los parámetros FISH, SISH e IHQ con los siguientes resultados (que se detallan para ambos evaluadores con  $\text{ratio} \geq 2$ ).

#### Correlación SISH evaluador 1 con IHQ

Coeficiente de correlación de Pearson N=148. Prob > (r) UNDER h0:Rho=0	
	<b>SISH Evaluador 1</b>
<b>IHQ</b>	0.78088 <0.0001

#### Correlación SISH Evaluador 2 con IHQ

Coeficiente de correlación de Pearson N=148. Prob > (r) UNDER h0:Rho=0	
	<b>SISH Evaluador 2</b>
<b>IHQ</b>	0.81121 <0.0001

#### Correlación FISH con IHQ

Coeficiente de correlación de Pearson N=148. Prob > (r) UNDER h0:Rho=0	
	<b>FISH</b>
<b>IHQ</b>	0.82211 <0.0001

En todos los casos existe una correlación muy alta y estadísticamente significativa.

## DISCUSIÓN

El adenocarcinoma gástrico es una de las neoplasias con mayor incidencia en nuestra sociedad, con un manejo diagnóstico y terapéutico difícil y asociado a una mortalidad elevada. A pesar de las mejoras introducidas en el tratamiento oncológico y de soporte, el pronóstico de los pacientes sigue siendo ominoso salvo en aquellos casos, infrecuentes, en los que es posible la realización de una cirugía con intención curativa y no se encuentra evidencia de afectación linfática locorregional en el análisis anatomopatológico de la pieza de resección quirúrgica (Haartgrink HH 2009). El tratamiento quimioterápico de la enfermedad avanzada aporta cierto control de la enfermedad, aumentando de manera significativa la supervivencia de los pacientes y mejorando su calidad de vida (Murad AM 1993; Vanhoefer U 2000, Ajani JA 2007, Van Cutsem E 2006, Cunningham D 2008, Kang et al 2009). A pesar de ello, la introducción de tratamientos citotóxicos más complejos no se ha visto acompañada de una mejora en los resultados de los mismos, habiéndose alcanzado una fase de meseta en la supervivencia de los pacientes (Wagner AD 2006) que sólo se ha logrado superar en el momento actual con la adición de un agente, Trastuzumab, dirigido frente a una alteración molecular específica: la sobreexpresión y/o amplificación génica del receptor de membrana con actividad tirosina Kinasa perteneciente a la familia de los receptores de factores de crecimiento denominado HER2 (van Cutsem E 2009).

El desarrollo de la biología molecular y su aplicación en el estudio y determinación de las alteraciones genéticas en una gran diversidad de tumores humanos y más concretamente del adenocarcinoma gástrico, ha permitido identificar marcadores moleculares de especial relevancia por sus implicaciones biológicas, diagnósticas, pronósticas y terapéuticas (Panani A

2008). La implementación de estos hallazgos en laboratorios de anatomía patológica con técnicas sencillas y reproducibles nos permite establecer un diagnóstico y clasificación más específico que derive posteriormente en un manejo clínico más preciso e individualizado.

Estas características hacen necesario un abordaje multidisciplinar en el estudio de esta neoplasia.

Para el desarrollo de nuevas terapias dirigidas es precisa la creación de grupos multidisciplinarios que integren la información aportada por cada especialista en el estudio individualizado del adenocarcinoma gástrico. Asimismo es esencial el desarrollo de una plataforma de trabajo que permita no sólo el estudio de factores moleculares de especial relevancia en esta neoplasia, sino también el desarrollo de aquellos biomarcadores que nos posibiliten predecir con seguridad la respuesta a un tratamiento específico.

En esta tesis se ha logrado constituir una plataforma de estudio del adenocarcinoma gástrico que aúna datos clínicos, histopatológicos y moleculares, integrando a especialistas de diferentes áreas en su manejo clínico-patológico.

## RESULTADOS CLINICO-PATOLÓGICOS

Los adenocarcinomas gástricos suelen presentarse con mayor frecuencia en varones, a partir de la 6ª década de la vida y suelen diagnosticarse en un 70% de los casos como enfermedad diseminada (Hartgrink HH 2009, Catalano V 2009).

En nuestra serie de adenocarcinomas gástricos se incluyeron 174 pacientes, de los cuales se obtuvo información clínica, patológica y molecular suficiente en 166 casos (95,4% del total). La enfermedad debutó como una neoplasia diseminada en el 51,8% de los casos, apareciendo metástasis en un momento posterior de la evolución de la enfermedad en el 37,34%. En total, la población de pacientes metastásicos agrupa al 89% de los enfermos incluidos (148 casos).

La edad en el momento del diagnóstico tumoral, el sexo de los pacientes y su distribución en tipos histológicos así como la frecuencia de aparición de las distintas localizaciones metastásicas son equivalentes a lo publicado en la literatura.

En el análisis estadístico efectuado en la población general de nuestra serie, no se encontró relación significativa entre la edad, el sexo o la presentación inicial en forma de enfermedad diseminada con el tipo histológico según la clasificación de Laurén. Esta falta de relación se verificó también para el subgrupo de población metastásica. En cuanto a la distribución de las localizaciones metastásicas según el tipo histológico, se encontró una diferencia estadísticamente significativa con una mayor incidencia de metástasis hepáticas en los pacientes con adenocarcinomas de tipo intestinal ( $p=0.0006$ ), mientras que en los de tipo difuso la aparición de carcinomatosis peritoneal fue significativamente más frecuente ( $p=0.0011$ ). Esta distinta distribución de las metástasis se ajusta a lo descrito clásicamente en trabajos sobre adenocarcinomas gástricos (Esaki Y 1990).

El análisis del tiempo hasta la progresión tumoral en la población metastásica de nuestra serie determinó una mediana de 6,14 meses (IC95% 5,19 – 7,23) con una mediana de supervivencia global de 11,37 meses (IC95% 9,0 – 13,83). Aunque estos resultados pueden parecer mejores que lo reconocido en diversos estudios y metaanálisis publicados, son similares a los obtenidos por el brazo control de un ensayo clínico en fase III recientemente publicados comparando el resultado del tratamiento quimioterápico estándar con el mismo tratamiento más Trastuzumab (Van Cutsem E 2009).

En el análisis del tiempo a la progresión tumoral y de la supervivencia global estratificado según el tipo histológico obtenemos diferencias estadísticamente significativas a favor del tipo intestinal (HR 0.707 IC95% 0.502 – 0.997,  $p=0.0479$ ). Los pacientes con adenocarcinomas difusos, en nuestra serie, recaen antes de su enfermedad a pesar del tratamiento quimioterápico y viven menos que los pacientes con adenocarcinomas de tipo intestinal. Esta diferencia otorga al tipo difuso un carácter de marcador pronóstico negativo en nuestros pacientes, probablemente relacionado con su mayor incidencia de carcinomatosis peritoneal.

Con estos datos hemos demostrado que la serie de casos de este trabajo es equiparable a la población general de pacientes con adenocarcinomas gástricos, constituyendo por tanto una plataforma válida para el estudio clínico y molecular de esta neoplasia.

## RELACIÓN ENTRE EL ONCOGÉN *HER2* Y OTROS RASGOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS EN EL ADENOCARCINOMA GÁSTRICO.

Como se reseñó en la introducción de esta tesis, desde los primeros estudios publicados en la última década del siglo pasado que describieron la relación entre el cáncer gástrico y el oncogén *HER2*, se ha constatado una mayor incidencia de tumores con tipo histológico intestinal entre aquellos con sobreexpresión de *HER2* o amplificación del mismo (Lin JT 1995, Wu MS 1997, Polkowski W 1999, Lemoine NR 1991). Esta mayor incidencia se confirmó en estudios recientes llevados a cabo en Finlandia, Corea y, más recientemente, en un ensayo multicéntrico que incluyó pacientes de 142 centros hospitalarios repartidos por 24 países de 4 continentes (estudio ToGA, Bang Yj 2009). Por el contrario, el único estudio desarrollado en España (Cortes-Funes H 2007, Grávalos C 2007) no encontró una relación estadísticamente significativa entre la expresión de *HER2* y el tipo histológico de acuerdo a la clasificación de Laurén. Esta discordancia con los resultados del resto de estudios publicados puede venir determinada por la falta de una revisión histológica centralizada de las muestras incluidas en el estudio. Asimismo, el empleo de diferentes técnicas diagnósticas (IHQ o FISH) según cada investigador del estudio y el uso de un criterio no estandarizado para la interpretación de los resultados inmunohistoquímicos pueden haber contribuido a ese resultado negativo.

En nuestra serie hemos comprobado la existencia de una relación estadísticamente significativa entre el adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal y la presencia de sobreexpresión del receptor *HER2* determinada por IHQ. De igual manera hemos demostrado la relación entre este tipo histológico



y la detección de la amplificación del oncogén HER2 tanto por FISH como por SISH dual. En concreto la tasa de sobreexpresión de HER2 en el adenocarcinoma intestinal alcanzó el 16% frente al 2% de positividad entre los casos difusos. Con respecto al estudio mediante técnicas de hibridación, la tasa de casos de tipo intestinal amplificados por FISH fue del 17,6% y por SISH dual de entre el 20% y el 15,9% dependiendo del evaluador y del ratio de amplificación ( $\geq 2$  ó  $\geq 3$ ). En los adenocarcinomas difusos el porcentaje de casos amplificados nunca es superior al 1,5% con independencia de la técnica de hibridación empleada. Estos datos coinciden con lo publicado anteriormente por otros autores, especialmente en las series con mayor número de casos analizados (Tanner M 2005, Ballestin C 2007, Marx AH 2009, Bang Y 2009, Grabsch H 2010).

Ante el diferente patrón de metástasis detectado en nuestros casos entre los adenocarcinomas de tipo intestinal, con mayor frecuencia de metástasis hepáticas, y los de tipo difuso con una incidencia significativamente más elevada de carcinomatosis peritoneal, hemos analizado la posible relación entre la localización de las metástasis y la presencia de sobreexpresión de HER2 o amplificación génica del mismo.

El análisis inmunohistoquímico no encontró ninguna relación entre la sobreexpresión de HER2 y la localización de las metástasis, al contrario de lo publicado por otros autores (Ougolkov A 2003). Igual resultado se obtuvo al estudiar los casos mediante FISH. Por el contrario, el estudio mediante SISH dual sí encontró una diferencia en la tasa de casos amplificados cuando se empleo el ratio  $\geq 2$  como punto de corte para considerar un caso como amplificado. En concreto, se evidenció una incidencia significativamente menor

de casos amplificados entre los que presentaban carcinomatosis peritoneal ( $p=0.0218$ ). Esta diferencia dejó de tener valor estadístico cuando se empleó como punto de corte el ratio  $\geq 3$  ( $p=0.0876$ ). Como se discute posteriormente en esta tesis, la posible necesidad de elevar el ratio a  $\geq 3$  para descartar casos polisómicos sin amplificación de *HER2* a la hora de interpretar los resultados del SISH dual, nos hace desestimar esta posible asociación como cierta, a la espera de nuevos resultados que lo verifiquen en series más amplias.

#### CORRELACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS DEL ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE *HER2* Y LAS TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN *IN SITU* FISH Y SISH DUAL EN ADENOCARCINOMA GÁSTRICO.

Desde que en 1987 Slamon y cols describieron por primera vez la relación entre la amplificación del oncogén *HER2* y algunos tipos de cáncer de mama (Slamon DJ 1987), tuvieron que pasar 12 años hasta que el desarrollo de un tratamiento dirigido frente a esta alteración molecular demostrase su éxito como terapia de 1ª línea frente al cáncer de mama metastásico (Baselga J 1999) y, posteriormente como tratamiento adyuvante en el mismo (Slamon 2005, Joensuu H 2006, Romond EH 2005, Piccart-Gebhart MJ 2005). Este éxito se ha tratado de reproducir en otras neoplasias en las que se ha comprobado la amplificación de *HER2* (estómago, pulmón, vejiga, etc...) (van Cutsem E 2009, R Ross HJ 2010, Laé M 2010), hasta que finalmente en 2009 se presentaron resultados positivos del uso de Trastuzumab en combinación con quimioterapia en adenocarcinomas gástricos metastásicos (van Cutsem E 2009).

Desde la primera aprobación de Trastuzumab para el tratamiento del cáncer de mama ha existido una gran controversia sobre los métodos con los que debe estudiarse el oncogén *HER2*. Esta polémica abarca la técnica específica a emplear (IHQ, FISH o métodos de hibridación *in situ* con microscopio de campo claro), la concordancia entre las distintas técnicas, los puntos de corte para la consideración de un resultado como amplificado e incluso los algoritmos de decisión de las técnicas a emplear (Tubbs RR, 2001, Mass RD, 2005, Arena V, 2009). La falta de un consenso oficial hasta el año 2007 (Wolff AC, 2007) y la ausencia de guías clínicas nacionales con recomendaciones equiparables (Bilous M 2003) ha contribuido a crear una situación que se ha bautizado recientemente como “la adivinanza de analizar *HER2*”, en la cual hasta una de cada cinco determinaciones es errónea (Allison M 2010, Phillips KA, 2009). Esta situación es de máxima importancia por cuanto la determinación adecuada del estado de *HER2* es esencial para seleccionar qué pacientes pueden beneficiarse de un tratamiento con agentes específicos como Trastuzumab, e incluso quienes pueden ser subsidiarios de su inclusión en ensayos clínicos en busca de nuevas indicaciones o moléculas anti*HER2*.

Esta falta de consenso no sólo afecta al estudio de las neoplasias de mama. El menor número de estudios realizados al respecto en cáncer gástrico y la falta de estandarización de los métodos de IHQ y FISH, ha provocado una carencia de resultados fiables sobre la concordancia de resultados entre las distintas técnicas aplicadas a las neoplasias malignas de estómago.

En esta tesis hemos estudiado la correlación entre los resultados del análisis inmunohistoquímico de la sobreexpresión de *HER2* con la determinación de su amplificación por técnicas de hibridación *in situ* fluorescente y argéntica. Para

ello se han empleado, en los casos de IHQ y FISH, métodos estandarizados y aprobados por las agencias reguladoras (FDA y EMEA) (Hofmann H 2008). Para el estudio mediante hibridación *in situ* argéntica se siguieron los procedimientos previamente publicados (Nitta H 2008), adaptándose la interpretación de los resultados a lo descrito para FISH (Hofmann H 2008b, Kanta Y 2006), dada la completa ausencia de estudios con SISH dual en cáncer gástrico publicados hasta el momento.

La correlación entre los resultados del estudio de IHQ y de FISH fue muy alta y estadísticamente significativa. Igual resultado positivo se obtuvo al analizar la correlación de los resultados de IHQ con los obtenidos por ambos evaluadores con el método de SISH. Todos los casos con IHQ 3+ presentaban amplificación determinada por FISH y SISH dual. Seis casos con IHQ 2+ resultaron amplificados por ambas técnicas, así como tres casos con IHQ 1+ y 3 casos con IHQ 0.

Estos resultados apoyan lo descrito en los últimos años por diversos autores que, empleando métodos de IHQ y FISH estandarizados, encontraron concordancia entre los resultados de ambas técnicas en el 86% a 96% de los casos (Ooi A 1997, Ishikawa T 1997, Takehana T 2002, Yano T 2006, Park DI 2006, Hofmann M 2008, Barros-Silva JD 1009, Marz AH 2009).

La diferencia con la pobre concordancia entre IHQ y FISH publicada en los primeros estudios realizados en cáncer gástrico (Lemoine NR 1991, Kameda T 1990, Hollywood DP 1993), viene posiblemente explicada por el empleo actual de métodos diagnósticos estandarizados en todos los trabajos, con diferencias

menores tanto en la fase analítica como en la postanalítica o de interpretación de los resultados.

Esta discordancia de resultados entre las series publicadas, tanto en mama como en cáncer gástrico se ha intentado explicar considerando los siguientes parámetros:

- Método de determinación de HER2.
- Falta de consenso en la metodología y evaluación de la inmunohistoquímica.
- Heterogeneidad tumoral.

En el ámbito de las dianas terapéuticas, un tema que ha suscitado una enorme controversia es qué diana hay que estudiar y por lo tanto qué método de determinación es el más correcto para el estudio de HER2 como marcador predictivo de respuesta a terapias dirigidas. Como ya se ha comentado en la introducción, los fármacos empleados frente a HER2 ejercen su acción uniéndose a la porción intra o extracelular del receptor de membrana, argumentación que algunos autores propugnan para establecer como método de determinación más correcto la detección del receptor HER2 mediante inmunohistoquímica. Además, esgrimen como argumento la enorme variabilidad en las series publicadas entre la expresión proteica del receptor HER2 determinada por inmunohistoquímica y la amplificación del gen detectada por FISH, con unos porcentajes que oscilan entre el 87% y el 100%.

Sin embargo, Sauter y cols proponen el FISH como el método “gold standard” para la determinación de *HER2*, demostrando que existe una correlación casi

perfecta entre la amplificación del gen y la expresión proteica. La variabilidad en la fase preanalítica a la que está sujeta la determinación proteica del receptor es la causa de la inconsistencia o falta de correlación en los resultados entre las distintas series publicadas, siendo la hibridación una técnica más reproducible y menos sujeta a variabilidad preanalítica.

En segundo lugar, no debemos olvidar la ausencia de guías fácilmente reproducibles para la interpretación de HER2 en cáncer gástrico. En el estudio ToGA, se llevaron a cabo modificaciones tanto en el protocolo de determinación de la inmunohistoquímica como en su forma de lectura respecto a las consensuadas hasta el momento en cáncer de mama. Las modificaciones técnicas resultaron de implementación difícil en laboratorios de anatomía patológica. Si nos centramos en el método de lectura propuesto, éste difería radicalmente del consensuado en mama y empleado hasta ese momento para la evaluación de HER2 en otras neoplasias humanas incluido el cáncer gástrico, y su interpretación estaba sujeta a una gran variabilidad intra e interobservador. Ésto ha originado que se estén reevaluando todas las muestras incluidas en el estudio con el fin de establecer un método de lectura más sencillo y reproducible (información verbal no confidencial comunicada por el laboratorio TARGOS al Dr. Fernando López-Ríos). Otro dato a tener en cuenta es la gran variedad de anticuerpos antiHER2 empleados en el estudio de esta determinación, utilizándose en plataformas diferentes con condiciones particulares para cada laboratorio, sin establecerse un anticuerpo y plataforma específico para su determinación.

Afortunadamente, a pesar de lo anteriormente comentado, nos encontramos en una situación privilegiada respecto a la vivida en mama, en la que tuvieron que

pasar años para establecer una guía de consenso. En la actualidad, se está desarrollando en nuestro país una guía de consenso nacional para la determinación de HER2 en cáncer gástrico, coordinada por el Dr. Fernando López-Ríos y en la que participa este doctorando.

Por último, un aspecto que diferencia el cáncer gástrico del cáncer de mama y que no debemos desdeñar es la heterogeneidad en la expresión y amplificación de *HER2* en el primero. Aunque no deja de ser otro tema polémico y de debate científico con diferentes cartas en revistas especializadas, numerosos grupos científicos han demostrado, tanto en estudios de inmunohistoquímica como de hibridación, la heterogeneidad en la alteración de HER2 y la posibilidad que esto conlleva de falsos negativos o de ausencia de correlación entre dos muestras de la misma neoplasia determinadas por técnicas diferentes (López-Ríos, datos sin publicar).

Es notable la coincidencia de nuestros resultados con los obtenidos en el estudio ToGA realizado sobre más de 3800 muestras (Bang Y 2009). En dicho estudio, la concordancia entre los resultados IHQ (considerando los casos 3+ y 2+ con FISH amplificado) y FISH fue del 87,5%. Aunque este dato se enmarca dentro del rango de estudios anteriormente publicados, ha sido ampliamente debatido el que un 23% de los casos presentaran amplificación del gen *HER2* sin sobreexpresión proteica del mismo en la membrana celular (IHQ 0, IHQ 1+). En nuestra serie el 21% de los casos amplificados, de acuerdo al resultado de FISH y SISH dual, no presentaban sobreexpresión de HER2. Ambos trabajos son los únicos hasta la fecha que han empleado un criterio modificado para la interpretación de los resultados siguiendo las recomendaciones del grupo de consenso (Hofmann M 2008).

A pesar de que esta cifra de casos discordantes es superior a lo encontrado en los estudios en cáncer de mama (Wolff AC 2007), en nuestra serie, la correlación de resultados entre los tres métodos de determinación del estado HER2 es estadísticamente significativa. Los casos con amplificación pero sin sobreexpresión pueden estar relacionados, como se ha descrito previamente (Tapia C 2007), con situaciones de amplificación baja ( $\text{ratio FISH} \leq 3$ ) que puede resultar en un bajo nivel de expresión de HER2 o con falsos positivos de la IHQ. Entre nuestros 3 casos con IHQ 1+ y FISH y SISH amplificados, todos presentaban un  $\text{ratio FISH} \leq 3$ . Los casos con IHQ 0 y amplificados se dividen en 2 casos con  $\text{ratio FISH} \leq 3$  y un posible falso negativo de IHQ ( $\text{ratio FISH}=9,9$ ;  $\text{ratio SISH}=11$ ).

En esta tesis hemos demostrado que, en base a la correlación elevada y estadísticamente significativa entre las técnicas empleadas, la inmunohistoquímica, la hibridación *in situ* fluorescente y la hibridación *in situ* argéntica son métodos apropiados y equivalentes para determinar el estado HER2 en muestras tumorales de cáncer gástrico.

#### CONCORDANCIA ENTRE LAS TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN *IN SITU* FISH Y SISH DUAL EN ADENOCARCINOMA GÁSTRICO.

En una primera fase de esta tesis se llevó a cabo un estudio piloto para verificar la correlación de los resultados obtenidos empleando tres métodos diferentes de hibridación *in situ*: fluorescente, cromogénica dual y argéntica dual.

En esta primera serie de 29 pacientes se obtuvo una correlación del 100% entre los resultados de FISH y CISH dual, siendo del 93,1% entre FISH y SISH



dua. La concordancia por tanto entre CISH dual y FISH fue perfecta. Este resultado confirma lo publicado por el único trabajo que ha estudiado la correlación entre FISH y un método de hibridación *in situ* colorimétrico en pacientes con adenocarcinoma gástrico (Park DI 2006), aunque en dicho trabajo se empleaba un CISH monocromo.

Aunque la concordancia entre CISH dual y FISH fue completa (y este último sigue siendo el método de referencia para el estudio de la amplificación de *HER2*), nuestra serie definitiva de 166 casos fue estudiada por FISH y SISH dual; al ser esta última una técnica automatizada que puede mejorar la reproducibilidad de la fase analítica si las plataformas técnicas, reactivos y protocolos se estandarizan convenientemente. El SISH dual puede obviar la necesidad de realizar el estudio de hibridación únicamente en centros de referencia (tras el adecuado entrenamiento para la realización de una correcta interpretación de los resultados) y, en el momento actual, se dispone de métodos duales que permiten la valoración adecuada del ratio *HER2/CEP17* y la detección de casos polisómicos (Hoff K 2010, Mayr D 2009, Nitta H 2008).

La concordancia de los resultados entre FISH y SISH dual en la serie completa fue del 96,4%. Todos los casos con FISH amplificado presentaban también amplificación por el método de SISH. El 3,6% de casos discordantes se limita a 6 casos, amplificados por SISH y no amplificados por FISH (sensibilidad = 1, especificidad = 0.956, concordancia = 0.964, kappa = 0,884).

Al no existir datos previos sobre el empleo de esta técnica para la valoración del estado de *HER2* en cáncer gástrico, nuestros resultados deben ser comparados con lo descrito en la única neoplasia previamente estudiada de un

modo equivalente: el cáncer de mama. En este sentido, la concordancia del 96,4% entre ambos métodos obtenida en nuestra serie cumple con los criterios establecidos (más del 95%) por las recomendaciones del Colegio Americano de Patología (CAP) y la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) al respecto (Wolff AC 2007). Nuestros resultados son equivalentes a lo publicado en cuatro trabajos realizados sobre la concordancia entre FISH y SISH monocromo en cáncer de mama (Tubbs R 2007, Vladich F 2007, Dietel M 2007, Papouchado BG 2010). Estos estudios reflejan una concordancia de resultados entre ambas técnicas que oscila del 94% al 100%. El estudio más recientemente publicado, que empleó SISH monocromo valorando HER2 y CEP17 en preparaciones histológicas paralelas alcanzó una concordancia del 98,9%.

Los seis casos discordantes en nuestra serie corresponden a muestras amplificadas por SISH que resultaron polisómicas por FISH, confirmándose la falta de amplificación de *HER2* en estos seis pacientes mediante análisis PCR en tiempo real. Estos resultados coinciden con los de estudios previamente publicados empleando técnicas de hibridación *in situ* con microscopio de campo claro tanto monocromo (Bartlett JM 2009, Dietel M 2007, Carbone A 2008, Francis GD 2009, Sousha S 2009, Yo SB 2010, Papouchado BG 2010) como duales (Garcia Caballero T 2010, Pedersen M 2009, Nitta H 2008); y tanto para el estudio de HER2 como de HER1.

Curiosamente, todos estos casos presentaban un ratio HER2/CEP17 por el método SISH entre 2,06 y 2,50 para todos los evaluadores. Al contrario ocurrió en los casos concordantes en los que los ratios eran siempre mayores de 3 (mediana = 8,1 y 6,02; Rango: 8,02 – 13,66). Por ello se llevó a cabo un nuevo

análisis de los resultados elevando el punto de corte del ratio HER2/CEP17 para considerar un caso amplificado a  $\geq 3$ . Esto resulta en una perfecta concordancia entre SISH dual y FISH (sensibilidad = 1; especificidad = 1; concordancia = 1; kappa = 1). Esta aproximación parece necesaria si tenemos en cuenta que la polisomía es la principal causa de discordancia de resultados entre observadores (Carbone A 2008). Un estudio recientemente publicado empleando una metodología similar a la utilizada en esta tesis ha llegado a la misma conclusión: la lectura del número de señales del centrómero del cromosoma 17 es la principal fuente de discrepancia entre los ratios de FISH y SISH (Papouchado BG 2010). En este punto, hay que considerar que es necesario ser estrictos a la hora de establecer las pautas de lectura en el método SISH. El empleo de objetivos de inmersión puede llevar a sobrevalorar el grado de amplificación de la neoplasia (López-Ríos, datos sin publicar), siendo recomendable el uso de objetivos de 40x ó 60x para evitar dar un resultado falso positivo. Si bien es verdad que, como ocurre en mama, es necesario el estudio de la polisomía del cromosoma 17 y su posible papel como marcador predictivo de respuesta a terapias antiHER2 (Hoffmann M 2008b).

La concordancia entre las técnicas de FISH y SISH para los distintos observadores fue muy elevada y estadísticamente significativa. Estos resultados se equiparan a los publicados en estudios similares en cáncer de mama (Tubbs R 2007, Vladich F 2007, Dietel M 2007, Papouchado BG 2010), en los que la concordancia entre observadores fue del 92,8% al 99,3%.

Una de las posibles causas de discordancia en los resultados de los métodos de amplificación en las distintas series publicadas, además de la polisomía antes mencionada, es la posible heterogeneidad de la amplificación dentro del

propio tumor (Grabsch H 2010), aunque esta hipótesis es discutida por otros autores como ya se ha comentado anteriormente (Bilous 2010, Marx AH 2009). En nuestra serie se observó heterogeneidad en forma de casos con amplificación focal en el 52% de los casos con resultado de FISH amplificado y en un 29% de los amplificados según el método de SISH. Esta heterogeneidad no fue motivo de discrepancia entre observadores dado que, antes de proceder a la lectura del resultado de FISH o SISH, se procedía a una revisión de toda la preparación histológica.

En resumen, en esta tesis hemos demostrado que el SISH dual es un método válido y fiable para la determinación del estado de HER2 en muestras de adenocarcinoma gástrico. La excelente concordancia con los resultados obtenidos por FISH y la ausencia de casos falsos negativos nos permite considerar validada esta nueva técnica diagnóstica. Los raros casos discordantes con el resultado del método de FISH son causados por la polisomía del cromosoma 17. La elevación del punto de corte del ratio HER2/CEP 17 para considerar un caso amplificado a  $\geq 3$  permite eliminar adecuadamente esta discordancia. La perfecta correlación de los resultados entre los distintos evaluadores permite considerar el método SISH dual como una técnica con una fase post-analítica de fácil implementación en la rutina clínica diaria.

## SOBREEXPRESIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE *HER2* COMO FACTOR PRONÓSTICO EN ADENOCARCINOMA GÁSTRICO.

Uno de los objetivos fundamentales de esta tesis fue el estudio del oncogén *HER2* como un posible factor con carácter pronóstico en el adenocarcinoma gástrico. Este análisis resulta especialmente interesante teniendo en cuenta los resultados discordantes publicados hasta la fecha.

Una revisión publicada en 2001 (Ross JS 2001) recogió los estudios presentados entre 1991 y 1998 en los cuales se analizaba la sobreexpresión y/o la amplificación de *HER2* en cáncer gástrico (Yonemura Y 1991, David L 1992, Tateishi M 1992, Sasano H 1993, Mizutani T 1993, Uchino S 1993, Kim JP 1994, Lee EY 1994, McCulloch PG 1995, Albino AP 1995, Lee HR 1996, Orita H 1997, Shun CT 1997, Yonemura Y 1998, Brien TP 1998). En varios de estos estudios se encontró una relación entre la sobreexpresión de *HER2* y una mayor incidencia de metástasis ganglionares en la pieza de gastrectomía, así como con un grado de diferenciación tumoral menor y un mayor estadio clínico al diagnóstico. De los 12 trabajos analizados que incluían información sobre la supervivencia de los pacientes, sólo en 3 se encontró una relación estadísticamente significativa entre la presencia de sobreexpresión de *HER2* (Orita H 1997, Yonemura Y 1991) o la amplificación del gen (Brien 1998) y una supervivencia menor de los pacientes cuando se realizó un análisis multivariante.

A pesar de estos estudios iniciales que parecían otorgar un carácter pronóstico independiente a la sobreexpresión o amplificación del gen *HER2* la controversia se ha mantenido sin resolver hasta el momento actual. Desde la

aparición del trabajo de Ross JS y cols en 2001 se han publicado diversos estudios que incluyen más de 100 pacientes cada uno, empleando técnicas de IHQ y criterios de interpretación de la misma más homogéneos junto a métodos FISH validados y aprobados para el estudio de la amplificación del oncogén *HER2* en cáncer de mama (Park DI 2006, Marx AH 2009, Grabsch H 2010). De estos estudios sólo se encontró una diferencia estadísticamente significativa en términos de supervivencia global en el grupo de pacientes con *HER2* amplificado en el trabajo realizado en Corea (Park DI 2006). Ni el estudio finlandés (Tanner M 2005), que empleaba el método de CISH monocromo para analizar la amplificación, ni los estudios alemán (Marx AH 2009) o británico-alemán (Grabsch H 2010) - empleando IHQ y FISH estandarizados - han logrado confirmar la relación entre amplificación o sobreexpresión de *HER2* y mal pronóstico del paciente que los primeros estudios al respecto describían.

En nuestra serie de pacientes metastásicos, al tratarse de una cohorte en la cual el 58% habían sido diagnosticados en estadios avanzados y el 42% desarrollaron metástasis a lo largo de la evolución de su enfermedad, hemos estudiado el posible carácter pronóstico de *HER2* de dos maneras complementarias.

En primer lugar, hemos analizado si la sobreexpresión de *HER2* está asociada con un diagnóstico de la enfermedad en un estadio más avanzado como se ha publicado previamente (Orita H 1997, Shun CT 1997). No hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la sobreexpresión de *HER2* por IHQ entre los pacientes con metástasis al diagnóstico y el resto de los incluidos en el estudio. Tampoco hemos encontrado relación estadísticamente significativa entre la presencia de amplificación por FISH ni por SISH

(independientemente del ratio elegido como punto de corte) y el diagnóstico inicial en estadios avanzados de la enfermedad.

En segundo lugar hemos analizado la posible relación entre la sobreexpresión o amplificación de HER2 y la supervivencia libre de progresión tumoral y a supervivencia global. La supervivencia libre de progresión no fue significativamente distinta entre los grupos con sobreexpresión de HER2 o sin ella. Por el contrario, el conjunto de pacientes con sobreexpresión de HER2 determinada por un resultado IHQ 3+ mostraron una supervivencia global estadísticamente superior a la mostrada por el grupo sin sobreexpresión.

Tanto el intervalo libre de progresión tumoral como la supervivencia global resultaron ser superiores estadísticamente en el grupo que mostraba amplificación de *HER2* comparado con el grupo no amplificado. Al utilizar el método SISH dual los resultados obtenidos por los evaluadores son equiparables a lo descrito mediante FISH.

En definitiva, en esta tesis hemos demostrado que la sobreexpresión proteica del receptor HER2 o su amplificación determinada por FISH o SISH es un factor de buen pronóstico, no asociándose con un diagnóstico tardío de la enfermedad y sí con una mayor supervivencia global.

Este resultado es comparable al obtenido en el estudio ToGA (Van Cutsem E 2009). En este ensayo clínico todos los pacientes incluidos mostraban sobreexpresión o amplificación de *HER2*, siendo aleatorizados entre recibir quimioterapia estándar o la misma quimioterapia más Trastuzumab. Aunque la conclusión principal del estudio es que la adición de Trastuzumab aumenta la supervivencia global de los pacientes con adenocarcinoma gástrico y

sobreexpresión o amplificación de *HER2*, es de destacar que la mediana de supervivencia del grupo que recibió sólo quimioterapia estándar fue de 11,1 meses, superior a la demostrada por cualquier esquema de quimioterapia en pacientes no seleccionados según el estado de *HER2*. Este resultado podría reforzar nuestra afirmación del carácter de buen pronóstico que tiene la sobreexpresión o amplificación de *HER2* en adenocarcinomas gástricos.

#### SOBREEXPRESIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE *HER2* COMO FACTOR PREDICTIVO DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON TRASTUZUMAB EN ADENOCARCINOMA GÁSTRICO.

La falta de ensayos clínicos randomizados con fármacos dirigidos específicamente frente al receptor *HER2* en pacientes con adenocarcinoma gástrico y sobreexpresión o amplificación del mismo, hace que no existan datos sólidos sobre el posible carácter predictivo de respuesta al tratamiento de las técnicas diagnósticas empleadas en esta tesis. Este hecho contrasta con la situación del estudio del oncogén *HER2* en cáncer de mama, neoplasia en la cual tanto un resultado IHQ 3+ como la amplificación evidenciada por FISH han sido validados y se utilizan de manera habitual como factores que predicen una respuesta positiva al tratamiento con Trastuzumab (Ross JS 2009).

Los estudios preclínicos fueron realizados empleando líneas celulares y xenoinjertos derivados de las mismas, con sobreexpresión y amplificación conocidas de este oncogén (Tanner M 2005, Gong SJ 2004, Matsui Y 2005, Kim SY 2008, Fujimoto-Ouchi 2007, Kim JW 2008). Los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo* han servido de base para el estudio, en seres humanos, del potencial terapéutico de agentes anti*HER2* como Trastuzumab o Lapatinib.



Recientemente se ha cuestionado (Grabsch H 2010) la reproducibilidad de estos resultados en la clínica, dado el carácter eminentemente heterogéneo del cáncer gástrico, con subpoblaciones dentro de un mismo tumor con distintos niveles de expresión o amplificación de *HER2*.

Los únicos resultados disponibles provienen de un análisis secundario de los resultados del estudio ToGA presentado en 2009 (Bang YJ 2009). Este subanálisis está realizado de acuerdo al nivel de sobreexpresión y del resultado FISH y encontró una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la supervivencia global, a favor de los pacientes con resultado de IHQ 3+ ó IHQ 2+ y FISH amplificado frente a aquellos con FISH amplificado pero IHQ1+ o IHQ 0 ó FISH no amplificado. Estos resultados parecen otorgar al estudio IHQ un carácter predictivo de la respuesta al tratamiento con Trastuzumab. Dentro de este grupo con mejor respuesta al tratamiento, la mayor parte de los pacientes (69,30%) presentaban amplificación del oncogén con un ratio > 4 mientras que en el grupo con menos sobreexpresión el porcentaje de pacientes con este ratio fue del 13,74% (Van Cutsem 2009). Estos datos hacen que no se pueda descartar la amplificación determinada por FISH como otro factor predictivo de respuesta a Trastuzumab.

Nuestra serie consta de un número muy pequeño de pacientes tratados con Trastuzumab, al no ser un tratamiento autorizado en España fuera de ensayo clínico en el momento de realizar esta tesis y al tratarse de una población tomada al azar en varios centros hospitalarios. El número de pacientes con sobreexpresión de *HER2* determinada por IHQ 3+ y que habían recibido tratamiento con Trastuzumab fue de 9. Esta cifra aumenta hasta 15 pacientes en el grupo que recibió Trastuzumab y presentaba amplificación de *HER2* por

SISH con  $\text{ratio} \geq 2$  ó 14 pacientes si la amplificación se determinó por FISH con igual ratio.

A pesar de este número reducido de casos, hemos realizado un análisis comparando la eficacia del tratamiento entre dos grupos: pacientes con sobreexpresión o amplificación de *HER2* y tratados con quimioterapia más Trastuzumab y pacientes sin sobreexpresión ni amplificación y tratados con quimioterapia estándar. Probablemente el número tan reducido de pacientes tratados con Trastuzumab ha impedido obtener diferencias significativas en la tasa de respuestas completas y de respuestas parciales de acuerdo al tratamiento empleado.

Sí hemos encontrado una mayor tasa de beneficio clínico, es decir de pacientes con respuesta parcial, completa ó estabilización prolongada de su enfermedad, en el grupo que recibió quimioterapia estándar más Trastuzumab. En estos pacientes dicha tasa se sitúa entre el 80% y el 100%, siendo la diferencia con el grupo sin sobreexpresión ni amplificación, y por tanto sin tratamiento con Trastuzumab, estadísticamente significativa. Esta diferencia se mantiene en todos los análisis realizados, empleando tanto el análisis IHQ como el resultado de FISH o SISH para seleccionar los grupos comparados.

Por ello, y a pesar de las limitaciones que en nuestra serie supone el escaso número de pacientes tratados con quimioterapia más Trastuzumab, podemos afirmar que la sobreexpresión del receptor *HER2* determinada por IHQ como 3+, ó la amplificación del oncogén *HER2* por FISH o SISH pueden considerarse como un factor predictivo de respuesta clínica al tratamiento con Trastuzumab.

## CONCLUSIONES

1. Se ha conseguido establecer una plataforma para el estudio de los adenocarcinomas gástricos humanos que integra información multidisciplinar.
2. Se ha identificado una correlación elevada entre la expresión proteica de HER2, determinada por inmunohistoquímica, y la amplificación del gen detectada por FISH o SISH.
3. De igual manera se ha podido determinar una concordancia excelente entre las dos metodologías de hibridación *in situ* utilizadas (FISH y SISH). El empleo de un ratio de SISH HER2 / CEP 17  $\geq 3$  para considerar amplificado un adenocarcinoma gástrico aumenta dicha concordancia, al excluir a los carcinomas con polisomía del cromosoma 17.
4. Englobando las conclusiones segunda y tercera, se han logrado validar las fases analíticas y post-analíticas de esta nueva técnica de SISH: hibridación *in situ* argéntica completamente automatizada, de doble coloración, sobre porta-objetos único.

5. La alteración del oncogén *HER2* no se encuentran relacionada con la edad, el sexo, el diagnóstico inicial en fase avanzada ni con la localización de las metástasis en los casos de adenocarcinoma gástrico, existiendo únicamente una relación estadísticamente significativa con el tipo histológico intestinal de la clasificación de Laurén.
6. La sobreexpresión del receptor *HER2* (estudiada por inmunohistoquímica) o su amplificación (estudiada por FISH o por SISH) identifica un subgrupo de pacientes con mejor supervivencia global y resulta predictivo de respuesta, en forma de beneficio clínico, al tratamiento con quimioterapia estándar y Trastuzumab.

# **BIBLIOGRAFIA**

**A**

Aarnio M, Salovaara R, Aaltonen LA et al. Features of gastric cancer in hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome. *Int J Cancer* 1997;74:551-555.

Ajani JA, Mayer RJ, Ota DM, Steele GD, Evans D, Roh M, Sugarbaker DJ, Dumas P, Gray C, Vena DA, et al. Preoperative and postoperative combination chemotherapy for potentially resectable gastric carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1993 Nov 17;85(22):1839-44

Ajani JA, Fodor MB, Tjulandin SA, Moiseyenko VM, Chao Y, Cabral Filho S, Majlis A, Assadourian S, Van Cutsem E. Phase II multi-institutional randomized trial of docetaxel plus cisplatin with or without fluorouracil in patients with untreated, advanced gastric, or gastroesophageal adenocarcinoma. *J Clin Oncol.* 2005 Aug 20;23(24):5660-7

Ajani JA, Moiseyenko VM, Tjulandin S, Majlis A, Constenla M, Boni C, Rodrigues A, Fodor M, Chao Y, Voznyi E, Marabotti C, Van Cutsem E; V-325 Study Group. Clinical benefit with docetaxel plus fluorouracil and cisplatin compared with cisplatin and fluorouracil in a phase III trial of advanced gastric or gastroesophageal cancer adenocarcinoma: the V-325 Study Group. *J Clin Oncol.* 2007 Aug 1;25(22):3205-9.

Ajani JA, Moiseyenko VM, Tjulandin S, Majlis A, Constenla M, Boni C, Rodrigues A, Fodor M, Chao Y, Voznyi E, Awad L, Van Cutsem E; V-325 Study Group. Quality of life with docetaxel plus cisplatin and fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil from a phase III trial for advanced gastric or gastroesophageal adenocarcinoma: the V-325 Study Group. *J Clin Oncol.* 2007 Aug 1;25(22):3210-6.

Albanell J, Baselga J. Trastuzumab, a humanized anti-*HER2* monoclonal antibody, for the treatment of breast cancer. *Drugs Today (Barc).* 1999 Dec;35(12):931-46.

Albino AP, Jaehne J, Altorki N, Blundell M, Urmacher C, Lauwers G, Niedzwiecki D, Kelsen DP. Amplification of *HER-2/neu* gene in human gastric adenocarcinomas: correlation with primary site. *Eur J Surg Oncol.* 1995 Feb;21(1):56-60.

Alexander HR, Lelsen D, Tepper JC. *Cancer of the Stomach* en *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 5th Edition. Editors: De Vita V, Hellman S, Rosenberg S. Philadelphia JB Lippincott 1997. Pgs 1021-1054.

Allgayer H, Babic R, Gruetzner KU, Tarabichi A, Schildberg FW, Heiss MM. c-erbB-2 is of independent prognostic relevance in gastric cancer and is associated with the expression of tumor-associated protease systems. *J Clin Oncol.* 2000 Jun;18(11):2201-9.

Allison M. The *HER2* testing conundrum. *Nat Biotechnol* 2010;28:117-9.

Antonioli DA, Goldman H. Changes in the location and type of gastric adenocarcinoma. *Cancer* 1982; 50:775-781.

Aoyagi K, Kohfuji K, Yano S, Murakami N, Miyagi M, Takeda J, Shirouzu K. Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and c-erbB-2 in superspreading-type and penetrating-type gastric carcinoma. *Kurume Med J.* 2001;48(3):197-200.

Area de Epidemiología Ambiental y Cáncer. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. La situación del cáncer en España. Ministerio de Sanidad y Consumo, 2005.

Arena V, Pennacchia I, Carbone A, Capelli A. Fluorescent *in situ* hybridization for human epidermal growth factor receptor 2 assessment in breast cancer: is it applicable as a primary test?. *J Clin Oncol.* 2009 Jul 1;27(19):e8.

Arnould L, Arveux P, Couturier J, Gelly-Marty M, Loustalot C, Ettore F, Sagan C, Antoine M, Penault-Llorca F, Vasseur B, Fumoleau P, Coudert BP. Pathologic complete response to trastuzumab-based neoadjuvant therapy is related to the level of HER-2 amplification. *Clin Cancer Res.* 2007 Nov 1;13(21):6404-9.

Austin CD, De Mazière AM, Pisacane PI, van Dijk SM, Eigenbrot C, Sliwkowski MX, Klumperman J, Scheller RH. Endocytosis and sorting of ErbB2 and the site of action of cancer therapeutics trastuzumab and geldanamycin. *Mol Biol Cell.* 2004 Dec;15(12):5268-82. Epub 2004 Sep 22.

## B

Bachmann MO, Alderson D, Edwards D, Wotton S, Bedford C, Peters TJ, Harvey IM. Cohort study in South and West England of the influence of specialization on the management and outcome of patients with oesophageal and gastric cancers. *Br J Surg.* 2002; 89(7):914-22.

Bajetta E, Buzzoni R, Mariani L, Beretta E, Bozzetti F, Bordogna G, Aitini E, Fava S, Schieppati G, Pinotti G, Visini M, Ianniello G, Di BM. Adjuvant chemotherapy in gastric cancer: 5-year results of a randomised study by the Italian Trials in Medical Oncology (ITMO) Group. *Ann Oncol.* 2002 Feb;13(2):299-307.

Bakir K, Uçak R, Tunçözgür B, Elbeyli L. Prognostic factors and c-erbB-2 expression in non-small-cell lung carcinoma (c-erbB-2 in non-small cell lung carcinoma). *Thorac Cardiovasc Surg.* 2002 Feb;50(1):55-8.

Ballestín C, López-Rios F, Vicioso L, Burgos F, Adrados M, Nieto S, López García-Asenjo JA, Mayorga M, Luna S, Gómez-Martín C. HER2/neu overexpression/amplification in advanced gastric cancer (AGC) patients (pts): Correlation with clinicopathological



parameters. Journal of Clinical Oncology, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 25, No. 18S (June 20 Supplement), 2007: 15046

Bang Y, Chung H, Xu J, Lordick F, Sawaki A, Lipatov O, Al-Sakaff N, See C, Rueschoff J, Van Cutsem E. Pathological features of advanced gastric cancer (GC): Relationship to human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) positivity in the global screening programme of the ToGA trial. J Clin Oncol 27:15s, 2009 (suppl; abstr 4556)

Bang Y, Kang Y, Kang W, Boku N, Chung H, Lanzaone S, Lechuga MJ, Sherman L, Chao R, Sobrero A. Sunitinib as second-line treatment for advanced gastric cancer: preliminary results from a phase II study. Journal of Clinical Oncology, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 25, No. 18S (June 20 Supplement), 2007: 4603.

Barber M, Murrell A, Ito Y et al. Mechanisms and sequelae of E-Cadherin silencing in hereditary diffuse gastric cancer. J Pathol 2008; 216:295-306.

Barros-Silva JD, Leitão D, Afonso L, Vieira J, Dinis-Ribeiro M, Frago M, Bento MJ, Santos L, Ferreira P, Rêgo S, Brandão C, Carneiro F, Lopes C, Schmitt F, Teixeira MR. Association of ERBB2 gene status with histopathological parameters and disease-specific survival in gastric carcinoma patients. Br J Cancer. 2009 Feb 10;100(3):487-93. Epub 2009 Jan 20.

Barry TS, Tse C, Goldstein LC et al. Quality control procedures are essential in accurate HER 2 FISH testing using automated morphometric image analysis. Breast Cancer Res Treat. 2007; 106 (suppl1):S217. Abstract 5032.

Bartlett JM, Going JJ, Mallon EA, Watters AD, Reeves JR, Stanton P, Richmond J, Donald B, Ferrier R, Cooke TG. Evaluating HER2 amplification and overexpression in breast cancer. J Pathol. 2001 Nov; 195(4):422-8.

Bartlett JM, Campbell FM, Ibrahim M, Wencyk P, Ellis I, Kay E, Connolly Y, O'Grady A, Di Palma S, Starczynski J, Morgan JM, Jasani B, Miller K. Chromogenic *in situ* hybridization: a multicenter study comparing silver *in situ* hybridization with FISH. Am J Clin Pathol. 2009 Oct;132(4):514-20.

Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim YM, Mendelsohn J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. Cancer Res. 1998 Jul 1;58(13):2825-31.

Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, Baughman S, Benz CC, Dantis L, Sklarin NT, Seidman AD, Hudis CA, Moore J, Rosen PP, Twaddell T, Henderson IC, Norton L. Phase II study of weekly intravenous trastuzumab (Herceptin) in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. Semin Oncol. 1999 Aug;26(4 Suppl 12):78-83.

Baselga J, Albanell J, Molina MA, Arribas J. Mechanism of action of Trastuzumab and scientific update. *Semin Oncol* 2001; 28(16):4-11.

Becker KF, Keller G, Hoefler H. The use of molecular biology in diagnosis and prognosis of gastric cancer. *Surg Oncol*. 2000; 9(1):5-11.

Berx G, Becker KF, Höfler H, van Roy F. Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene. *Hum Mutat*. 1998;12(4):226-37.

Bhargava R, Lal P, Chen B. Chromogenic *in situ* hybridization for the detection of HER-2/neu gene amplification in breast cancer with an emphasis on tumors with borderline and low-level amplification: does it measure up to fluorescence *in situ* hybridization?. *Am J Clin Pathol*. 2005 Feb;123(2):237-43.

Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Isola J, Lebeau A, Moreno A, Penault-Llorca F, Rüschhoff J, Tomasic G, van de Vijver M. Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines. *Mod Pathol*. 2003 Feb;16(2):173-82.

Bilous M, Osamura RY, Rüschhoff J, van de Vijver M, Hanna W, Penault-Llorca F, Roche P. HER-2 amplification is highly homogenous in gastric cancer. *Hum Pathol*. 2010 Feb;41(2):304-5; author reply 305-6. Epub 2009 Nov 14.

Birkmeyer JD, Stukel TA, Siewers AE, Goodney PP, Wennberg DE, Lucas FL. Surgeon volume and operative mortality in the United States. *N Engl J Med*. 2003; 349(22):2117-27.

Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H et al. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 1995; 55: 2111-2115.

Boige V, Pignon J, Saint-Aubert V, et al. Final results of a randomized trial comparing preoperative 5-Fluorouracil /cisplatin to surgery alone in adenocarcinoma of the stomach and lower esophagus(ASLE):FNLCC ACCORD07-FFCD 9703 Trial. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2007; 25(Suppl):4510.

Boku N, Chin K, Hosokawa K, Ohtsu A, Tajiri H, Yoshida S, Yamao T, Kondo H, Shirao K, Shimada Y, Saito D, Hasebe T, Mukai K, Seki S, Saito H, Johnston PG. Biological markers as a predictor for response and prognosis of unresectable gastric cancer patients treated with 5-fluorouracil and cis-platinum. *Clin Cancer Res*. 1998; 4(6):1469-74.

Bonenkamp JJ, Songun I, Hermans J et al. Randomised comparison of morbidity after D1 and D2 dissection for gastric cancer in 996 Dutch patients. *Lancet*. 1995 Mar 25;345(8952):745-8

Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H, Clark GM, Fernö M, Fuqua SA, Killander D, McGuire WL. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res*. 1990 Jul 15; 50(14):4332-7.

Borrmann R. Geschwulste des magens and duodenums. En: Henke F, Lubarsch O. *Handbuch der speziellen pathologischen anatomie and histology*. Berlin. Springer-Verlag; 1926. Pg 865.

Botterweck AA, Schouten LJ, Volovics A et al. Trends in incidence of adenocarcinoma of the oesophagus and gastric cardia in ten European countries. *Int J Epidemiol* 2000;29:645-654

Bouché O, Ychou M, Burtin P, Bedenne L, Ducreux M, Lebreton G, Baulieux J, Nordlinger B, Martin C, Seitz JF, Tigaud JM, Echinard E, Stremsdoerfer N, Milan C, Rougier P; Fédération Francophone de Cancérologie Digestive Group. Adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil and cisplatin compared with surgery alone for gastric cancer: 7-year results of the FFCD randomized phase III trial (8801). *Ann Oncol*. 2005 Sep;16(9):1488-97. Epub 2005 Jun 6.

Bozzetti F, Marubini E, Bonfanti G, Miceli R, Piano C, Gennari L. Subtotal versus total gastrectomy for gastric cancer: five-year survival rates in a multicenter randomized Italian trial. Italian Gastrointestinal Tumor Study Group. *Ann Surg*. 1999 Aug;230(2):170-8.

Bramhall SR, Hallissey MT, Whiting J, Scholefield J, Tierney G, Stuart RC, Hawkins RE, McCulloch P, Maughan T, Brown PD, Baillet M, Fielding JW. Marimastat as maintenance therapy for patients with advanced gastric cancer: a randomised trial. *Br J Cancer*. 2002 Jun 17;86(12):1864-70.

Bravo LE, Van Doorn LJ, Realpe JL et al. Virulence-associated genotypes of *Helicobacter pylori*: do they explain the African enigma?. *Am J Gastroenterol* 2002 ; 97:2839-2842.

Brennan MF. Lymph-node dissection for gastric cancer. *N Engl J Med*. 1999 Mar 25;340(12):956-8

Brien TP, Depowski PL, Sheehan CE, Ross JS, McKenna BJ. Prognostic factors in gastric cancer. *Mod Pathol*. 1998 Sep;11(9):870-7.

Brooks-Wilson AR, Kaurah P, Suriano C et al. Germline E-Cadherin mutations in hereditary diffuse gastric cancer: Assessment of 42 new families and review of genetic screening criteria. *J Med Genet* 2004; 41: 508-517.

Brown LM, Devesa SS. Epidemiologic trends in esophageal and gastric cancer in the United States. *Surg Oncol Clin N Am* 2002; 11:235-256.

Bunt AM, Hogendoorn PC, van de Velde CJ, Bruijn JA, Hermans J. Lymph node staging standards in gastric cancer. *J Clin Oncol*. 1995 Sep;13(9):2309-16.

Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, Lemmon MA, Sliwkowski MX, Ward CW, Yokoyama S. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell*. 2003 Sep;12(3):541-52.

## C

Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. 2002 May 31;296(5573):1655-7.

Cappuzzo F, Bemis L, Varella-Garcia M. *HER2* mutation and response to trastuzumab therapy in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2006 Jun 15;354(24):2619-21.

Carbone A, Botti G, Gloghini A, Simone G, Truini M, Curcio MP, Gasparini P, Mangia A, Perin T, Salvi S, Testi A, Verderio P. Delineation of *HER2* gene status in breast carcinoma by silver *in situ* hybridization is reproducible among laboratories and pathologists. *J Mol Diagn*. 2008 Nov;10(6):527-36. Epub 2008 Oct 2.

Carneiro F. The distinction between dysplasia and truly invasive cancer. Classification of gastric carcinomas. *Curr Diagn Pathol* 1997; 4:51-59

Carriaga MT, Henson DE. The histologic grading of cancer. *Cancer* 1995; 75:406-421

Cascinu S, Graziano F, Del Ferro E, Staccioli MP, Ligi M, Carnevali A, Muretto P, Catalano G. Expression of p53 protein and resistance to preoperative chemotherapy in locally advanced gastric carcinoma. *Cancer*. 1998; 83(9):1917-22.

Catalano V, Labianca R, Beretta GD, Gatta G, de Braud F, Van Cutsem E. Gastric cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2009 Aug;71(2):127-64. Epub 2009 Feb 20.

Chiu KY, Loke SL, Ho FC. Immunohistochemical demonstration of c-erbB-2 oncoprotein in gastric adenocarcinoma: comparison of cryostat and paraffin wax sections and effect of fixation. *J Clin Pathol*. 1994 Feb; 47(2):117-21.

Choudhury A, Kiessling R. Her-2/neu as a paradigm of a tumor-specific target for therapy. *Breast Dis*. 2004;20:25-31.

Christianson TA, Doherty JK, Lin YJ, Ramsey EE, Holmes R, Keenan EJ, Clinton GM. NH2-terminally truncated HER-2/neu protein: relationship with shedding of the extracellular domain and with prognostic factors in breast cancer. *Cancer Res*. 1998 Nov 15;58(22):5123-9.

Ciampa A, Xu B, Ayata G, Baiyee D, Wallace J, Wertheimer M, Edmiston K, Khan A. HER-2 status in breast cancer: correlation of gene amplification by FISH with immunohistochemistry expression using advanced cellular imaging system. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2006 Jun;14(2):132-7.

Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med*. 2000 Apr;6(4):443-6.

Correa P, Miller MJ. Carcinogenesis, apoptosis and cell proliferation. *Br Med Bull* 1998; 54: 151-162.

Cortés-Funes H, Rivera F, Alés I, Márquez A, Velasco A, Colomer R, García-Carbonero R, Sastre J, Guerra J, Grávalos C. Phase II of trastuzumab and cisplatin in patients (pts) with advanced gastric cancer (AGC) with HER2/neu overexpression/amplification. *Journal of Clinical Oncology*, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 25, No. 18S (June 20 Supplement), 2007: 4613

Costanzo F, Gasperoni S, Manzione L, Bisagni G, Labianca R, Bravi S, Cortesi E, Carlini P, Bracci R, Tomao S, Messerini L, Arcangeli A, Torri V, Bilancia D, Floriani I, Tonato M; Italian Oncology Group for Cancer Research. Adjuvant chemotherapy in completely resected gastric cancer: a randomized phase III trial conducted by GOIRC. *J Natl Cancer Inst*. 2008 Mar 19;100(6):388-98. Epub 2008 Mar 11.

Csendes A, Burdiles P, Rojas J, Braghetto I, Diaz JC, Maluenda F. A prospective randomized study comparing D2 total gastrectomy versus D2 total gastrectomy plus splenectomy in 187 patients with gastric carcinoma. *Surgery*. 2002 Apr;131(4):401-7.

Cuello M, Ettenberg SA, Clark AS, Keane MM, Posner RH, Nau MM, Dennis PA, Lipkowitz S. Down-regulation of the erbB-2 receptor by trastuzumab (herceptin) enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in breast and ovarian cancer cell lines that overexpress erbB-2. *Cancer Res*. 2001 Jun 15;61(12):4892-900.

Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, Thompson JN, Van de Velde CJ, Nicolson M, Scarffe JH, Lofts FJ, Falk SJ, Iveson TJ, Smith DB, Langle RE, Verma M, Weeden S, Chua YJ, MAGIC Trial Participants. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N Engl J Med*. 2006 Jul 6;355(1):11-20.

Cunningham D, Starling N, Rao S, Iveson T, Nicolson M, Coxon F, Middleton G, Daniel F, Oates J, Norman AR; Upper Gastrointestinal Clinical Studies Group of the National Cancer Research Institute of the United Kingdom. Capecitabine and oxaliplatin for advanced esophagogastric cancer. *N Engl J Med*. 2008 Jan 3;358(1):36-46

Cuschieri A, Fayers P, Fielding J, Craven J, Bancewicz J, Joypaul V, Cook P. Postoperative morbidity and mortality after D1 and D2 resections for gastric cancer: preliminary results of the MRC randomised controlled surgical trial. The Surgical Cooperative Group. *Lancet*. 1996 Apr 13;347(9007):995-9.

## D

Dal Lago L, Durbecq V, Desmedt C, Salgado R, Verjat T, Lespagnard L, Ma Y, Veys I, Di Leo A, Sotiriou C, Piccart M, Larsimont D. Correction for chromosome-17 is critical for the determination of true Her-2/neu gene amplification status in breast cancer. *Mol Cancer Ther*. 2006 Oct;5(10):2572-9.

Danesh J. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: systematic review of the epidemiological studies. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13: 851-856.

Danscher G, Nørsgaard JO. Light microscopic visualization of colloidal gold on resin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem*. 1983 Dec;31(12):1394-8.

David L, Seruca R, Nesland JM, Soares P, Sansonetti F, Holm R, Børresen AL, Sobrinho-Simões M. c-erbB-2 expression in primary gastric carcinomas and their metastases. *Mod Pathol*. 1992 Jul;5(4):384-90.

De Vita F, Giuliani F, Orditura M, Maiello E, Galizia G, Di Martino N, Montemurro F, Carteni G, Manzione L, Romito S, Gebbia V, Ciardiello F, Catalano G, Colucci G; Gruppo Oncologico Italia Meridionale. Adjuvant chemotherapy with epirubicin, leucovorin, 5-fluorouracil and etoposide regimen in resected gastric cancer patients: a randomized phase III trial by the Gruppo Oncologico Italia Meridionale (GOIM 9602 Study). *Ann Oncol*. 2007 Aug;18(8):1354-8. Epub 2007 May 24.

Degiuli M, Sasako M, Ponti A, Soldati T, Danese F, Calvo F. Morbidity and mortality after D2 gastrectomy for gastric cancer: results of the Italian Gastric Cancer Study Group prospective multicenter surgical study. *J Clin Oncol*. 1998 Apr;16(4):1490-3.

Delord JP, Allal C, Canal M, Mery E, Rochaix P, Hennebelle I, Pradines A, Chatelut E, Bugat R, Guichard S, Canal P. Selective inhibition of *HER2* inhibits AKT signal transduction

and prolongs disease-free survival in a micrometastasis model of ovarian carcinoma. *Ann Oncol.* 2005 Dec;16(12):1889-97. Epub 2005 Oct 11.

Dent DM, Werner ID, Novis B, Cheverton P, Brice P. Prospective randomized trial of combined oncological therapy for gastric carcinoma. *Cancer.* 1979 Aug;44(2):385-91

Dent DM, Madden MV, Price SK. Randomized comparison of R1 and R2 gastrectomy for gastric carcinoma. *Br J Surg.* 1988 Feb;75(2):110-2.

Diermeier S, Horváth G, Knuechel-Clarke R, Hofstaedter F, Szöllosi J, Brockhoff G. Epidermal growth factor receptor coexpression modulates susceptibility to Herceptin in *HER2/neu* overexpressing breast cancer cells via specific erbB-receptor interaction and activation. *Exp Cell Res.* 2005 Apr 1;304(2):604-19. Epub 2005 Jan 21

Dietel M, Ellis IO, Höfler H, Kreipe H, Moch H, Dankof A, Kölbl K, Kristiansen G. Comparison of automated silver enhanced *in situ* hybridisation (SISH) and fluorescence ISH (FISH) for the validation of HER2 gene status in breast carcinoma according to the guidelines of the American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists. *Virchows Arch.* 2007 Jul;451(1):19-25. Epub 2007 Jun 12.

Douglass HO Jr, Lavin PT, Goudsmit A, Klaassen DJ, Paul AR. An Eastern Cooperative Oncology Group evaluation of combinations of methyl-CCNU, mitomycin C, Adriamycin, and 5-fluorouracil in advanced measurable gastric cancer (EST 2277). *J Clin Oncol.* 1984 Dec;2(12):1372-81.

Downs-Kelly E, Pettay J, Hicks D, Skacel M, Yoder B, Rybicki L, Myles J, Sreenan J, Roche P, Powell R, Hainfeld J, Grogan T, Tubbs R. Analytical validation and interobserver reproducibility of EnzMet GenePro: a second-generation bright-field metallography assay for concomitant detection of HER2 gene status and protein expression in invasive carcinoma of the breast. *Am J Surg Pathol.* 2005 Nov;29(11):1505-11.

Dragovich T, McCoy S, Fenoglio-Preiser CM, Wang J, Benedetti JK, Baker AF, Hackett CB, Urba SG, Zaner KS, Blanke CD, Abbruzzese JL. Phase II trial of erlotinib in gastroesophageal junction and gastric adenocarcinomas: SWOG 0127. 1. *J Clin Oncol.* 2006 Oct 20;24(30):4922-7.

Dybdal N, Leiberman G, Anderson S, McCune B, Bajamonde A, Cohen RL, Mass RD, Sanders C, Press MF. Determination of HER2 gene amplification by fluorescence *in situ* hybridization and concordance with the clinical trials immunohistochemical assay in women with metastatic breast cancer evaluated for treatment with trastuzumab. *Breast Cancer Res Treat.* 2005 Sep; 93(1):3-11.

**E**

Earle CC, Maroun JA. Adjuvant chemotherapy after curative resection for gastric cancer in non-Asian patients: revisiting a meta-analysis of randomised trials. *Eur J Cancer*. 1999 Jul;35(7):1059-64.

Edge, S.B.; Byrd, D.R.; Compton, C.C.; Fritz, A.G.; Greene, F.L.; Trotti, A. *AJCC Cancer Staging manual*. 7<sup>th</sup> edition. New York; Springer 2010.

Eisenhauer EA. From the molecule to the clinic--inhibiting *HER2* to treat breast cancer. *N Engl J Med*. 2001 Mar 15;344(11):841-2.

Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*. 2006 Aug;7(8):606-19.

Enzinger PC, Fidias P, Meyerhardt J, Stuart K, Fuchs C, Huberman M, Goldstein R, Attawia M, Lawrence C, Zhu AX. Phase II study of bevacizumab and docetaxel in metastatic esophageal and gastric cancer. 2006 Gastrointestinal Cancers Symposium. Abstract num 68.

Esaki Y, Hirayama R, Hirokawa K. A comparison of patterns of metastasis in gastric cancer by histologic type and age. *Cancer*. 1990 May 1;65(9):2086-90.

Eslick GD, Lim LL, Byles JE et al. Association of *Helicobacter pylori* infection with gastric carcinoma: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 1999; 94: 2373-2379.

**F**

Faltus T, Yuan J, Zimmer B, Krämer A, Loibl S, Kaufmann M, Strebhardt K. Silencing of the *HER2/neu* gene by siRNA inhibits proliferation and induces apoptosis in *HER2/neu*-overexpressing breast cancer cells. *Neoplasia*. 2004 Nov-Dec;6(6):786-95.

Faulk WP, Taylor GM. An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry*. 1971 Nov;8(11):1081-3.

Felley CP, Pignatelli B, Van Melle GD et al. Oxidative stress in gastric mucosa of asymptomatic humans infected with *Helicobacter Pylori*: effect of bacterial eradication. *Helicobacter* 2002; 7:342-348.



Feng CW, Wang LD, Jiao LH, Liu B, Zheng S, Xie XJ. Expression of p53, inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in gastric precancerous and cancerous lesions: correlation with clinical features. *BMC Cancer*. 2002 Apr 29;2:8.

Ferguson DJ, Burns J, Harrison D, Jonasson JA, McGee JO. Chromosomal localization of genes by scanning electron microscopy using *in situ* hybridization with biotinylated probes: Y chromosome repetitive sequences. *Histochem J*. 1986 May;18(5):266-70.

Ferlay J, Autier P, Oniol M et al. Estimates of the Cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 2007; 18:581-592.

Ferry DR, Anderson M, Beddard K, Tomlinson S, Atherfold P, Obszynska J, Harrison R, Jankowski J. A phase II study of gefitinib monotherapy in advanced esophageal adenocarcinoma: evidence of gene expression, cellular, and clinical response. *Clin Cancer Res*. 2007 Oct 1;13(19):5869-75.

Findlay M, Cunningham D, Norman A, Mansi J, Nicolson M, Hickish T, Nicolson V, Nash A, Sacks N, Ford H, et al. A phase II study in advanced gastro-esophageal cancer using epirubicin and cisplatin in combination with continuous infusion 5-fluorouracil (ECF). *Ann Oncol*. 1994 Sep;5(7):609-16

Fleisher AS, Esteller M, Wang S, Tamura G, Suzuki H, Yin J, Zou TT, Abraham JM, Kong D, Smolinski KN, Shi YQ, Rhyu MG, Powell SM, James SP, Wilson KT, Herman JG, Meltzer SJ. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability. *Cancer Res*. 1999; 59(5):1090-5.

Fonseca L, Yonemura Y, De Aretxabala X, Yamaguchi A, Miwa K, Miyazaki I. p53 detection as a prognostic factor in early gastric cancer. *Oncology*. 1994; 51(6):485-90.

Francis GD, Jones MA, Beadle GF, Stein SR. Bright-field *in situ* hybridization for HER2 gene amplification in breast cancer using tissue microarrays: correlation between chromogenic (CISH) and automated silver-enhanced (SISH) methods with patient outcome. *Diagn Mol Pathol*. 2009 Jun;18(2):88-95.

Franco AT, Johnston E, Krishna U et al. Regulation of gastric carcinogenesis by *Helicobacter pylori* virulence factors. *Cancer Res* 2008; 68: 379-387.

Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:481-507.

Fujimoto-Ouchi K, Sekiguchi F, Yasuno H, Moriya Y, Mori K, Tanaka Y. Antitumor activity of trastuzumab in combination with chemotherapy in human gastric cancer xenograft models. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2007 May;59(6):795-805. Epub 2006 Oct 10.

Fukushige S, Matsubara K, Yoshida M, Sasaki M, Suzuki T, Semba K, Toyoshima K, Yamamoto T. Localization of a novel v-erbB-related gene, c-erbB-2, on human chromosome 17 and its amplification in a gastric cancer cell line. *Mol Cell Biol.* 1986 Mar;6(3):955-8.

## G

Gadgeel SM, Shields AF, Heilbrun LK, Labadidi S, Zalupski M, Chaplen R, Philip PA. Phase II study of paclitaxel and carboplatin in patients with advanced gastric cancer. *Am J Clin Oncol.* 2003 Feb;26(1):37-41.

Galizia G, Lieto E, Orditura M, Castellano P, Mura AL, Imperatore V, Pinto M, Zamboli A, De Vita F, Ferraraccio F. Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression is associated with a worse prognosis in gastric cancer patients undergoing curative surgery. *World J Surg.* 2007; 31(7):1458-68.

García I, Vizoso F, Martín A, Sanz L, Abdel-Lah O, Raigoso P, García-Muñiz JL. Clinical significance of the epidermal growth factor receptor and HER2 receptor in resectable gastric cancer. *Ann Surg Oncol.* 2003 Apr;10(3):234-41.

García-Caballero T, Grabau D, Green A R, Gregory J, Schad A, Kohlwes E, Ellis I O, Watts S & Mollerup J. Determination of HER2 amplification in primary breast cancer using dual-colour chromogenic *in situ* hybridization is comparable to fluorescence *in situ* hybridization: a European multicentre study involving 168 specimens. *Histopathology.* 2010; 56, 472–480.

Gennari R, Menard S, Fagnoni F, Ponchio L, Scelsi M, Tagliabue E, Castiglioni F, Villani L, Magalotti C, Gibelli N, Oliviero B, Ballardini B, Da Prada G, Zambelli A, Costa A. Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing *HER2*. *Clin Cancer Res.* 2004 Sep 1;10(17):5650-5.

Ghaderi A, Vasei M, Maleck-Hosseini SA, Gharesi-Fard B, Khodami M, Doroudchi M, Modjtahedi H. The expression of c-erbB-1 and c-erbB-2 in Iranian patients with gastric carcinoma. *Pathol Oncol Res.* 2002;8(4):252-6. Epub 2003 Feb 11.

Giuliani F, Molica S, Maiello E, Battaglia C, Gebbia V, Di Bisceglie M, Vinciarelli G, Gebbia N, Colucci G; Gruppo Oncologico dell' Italia Meridionale (prot. 2106). Irinotecan (CPT-11) and mitomycin-C (MMC) as second-line therapy in advanced gastric cancer: a phase II study of the Gruppo Oncologico dell' Italia Meridionale (prot. 2106). *Am J Clin Oncol.* 2005 Dec;28(6):581-5.

Goldgar DE, Easton DF, Cannon-Albright LA et al. Systematic population-based assessment of cancer risk in the first degree relatives of cancer probands. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86:1600-1608.

Gong SJ, Jin CJ, Rha SY, Chung HC. Growth inhibitory effects of trastuzumab and chemotherapeutic drugs in gastric cancer cell lines. *Cancer Lett.* 2004 Oct 28;214(2):215-24.

Gong Y, Gilcrease M, Sneige N. Reliability of chromogenic *in situ* hybridization for detecting HER-2 gene status in breast cancer: comparison with fluorescence *in situ* hybridization and assessment of interobserver reproducibility. *Mod Pathol.* 2005 Aug;18(8):1015-21.

Goseki N, Takizawa T, Koike M. Differences in the mode of the extension of gastric cancer classified by histological type: new histological classification of gastric carcinoma. *Gut.* 1992; 33(5):606-12

Gotoda T, Yanagisawa A, Sasako M, Ono H, Nakanishi Y, Shimoda T, Kato Y. Incidence of lymph node metastasis from early gastric cancer: estimation with a large number of cases at two large centers. *Gastric Cancer* 2000; 3: 219-225.

Gotoda T, Yamamoto H, Soetikno RM. Endoscopic submucosal dissection of early gastric cancer. *J Gastroenterol.* 2006 Oct;41(10):929-42

Gouzi JL, Huguier M, Fagniez PL, et al. Total versus subtotal gastrectomy for adenocarcinoma of the gastric antrum. A French prospective controlled study. *Ann Surg* 1989;209:162–6. *Gastric Cancer.* 2000 Dec;3(4):219-225.

Grabsch H, Sivakumar S, Gray S, Gabbert HE, Müller W. HER2 expression in gastric cancer: Rare, heterogeneous and of no prognostic value - conclusions from 924 cases of two independent series. *Cell Oncol.* 2010;32(1-2):57-65.

Grau JJ, Estapé J, Fuster J, Filella X, Visa J, Terés J, Soler G, Albiol S, García-Valdecasas JC, Grande L, Bombí J, Bordas J, Alcobendas F. Randomized trial of adjuvant chemotherapy with mitomycin plus fluorouracil versus mitomycin alone in resected locally advanced gastric cancer. *J Clin Oncol.* 1998 Mar;16(3):1036-9.

Gravalos C, Márquez A, García-Carbonero R, Rivera F, Colomer R, Sastre J, Velasco A, Alonso V, Ales I, Gómez-Martín C. Correlation between Her2/neu overexpression/amplification and clinicopathological parameters in advanced gastric cancer patients: A prospective study. 2007 Gastrointestinal Cancers Symposium Abstract 89.

Green FL, Page DL, Fleming ID et al. *AJCC Cancer Staging manual.* 6<sup>th</sup> edition. New York; Springer 2002.

Grünwald V, Hidalgo M. Developing inhibitors of the epidermal growth factor receptor for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst.* 2003 Jun 18;95(12):851-67.

Guilford PJ, Hopkins JB, Grady WM et al. E-Cadherin germline mutations define an inherited cancer syndrome dominant by diffuse gastric cancer. *Hum Mutat* 1999; 14:249-255.

Gupta D, Middleton LP, Whitaker MJ, Abrams J. Comparison of fluorescence and chromogenic *in situ* hybridization for detection of HER-2/neu oncogene in breast cancer. *Am J Clin Pathol*. 2003 Mar;119(3):381-7.

Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, Price KN, S  ve-S  derborgh J, Anbazhagan R, Styles J, Rudenstam CM, Golouh R, Reed R, et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol*. 1992 Jul;10(7):1049-56

Guy PM, Platko JV, Cantley LC, Cerione RA, Carraway KL 3rd. Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Aug 16;91(17):8132-6.

Gylling A, Abdel-Rahman WM, Juhola Met al. Is gastric cancer part of the tumour spectrum of hereditary non-polyposis colorectal cancer? A molecular genetic study. *Gut*. 2007; 56: 926-933.

## H

Hainfeld JF, Powell RD. New frontiers in gold labeling. *J Histochem Cytochem*. 2000 Apr;48(4):471-80.

Hainfeld JF, Powell RD. Silver and gold based autometallography of Nanogold. En Hacker GW, Gu J (editors). *Gold and silver staining: techniques in molecular morphology*. Boca Raton: CRC Press; 2002. Pags 29-46.

Hallisey MT, Dunn JA, Ward LC, Allum WH. The second British Stomach Cancer Group trial of adjuvant radiotherapy or chemotherapy in resectable gastric cancer: five-year follow-up. *Lancet*. 1994 May 28;343(8909):1309-12

Han SW, Oh DY, Im SA, Park SR, Lee KW, Song HS, Lee NS, Lee KH, Choi IS, Lee MH, Kim MA, Kim WH, Bang YJ, Kim TY. Phase II study and biomarker analysis of cetuximab combined with modified FOLFOX6 in advanced gastric cancer. *Br J Cancer*. 2009 Jan 27;100(2):298-304.

Handley DA. The development and application of colloidal gold as a microscopic probe; methods for synthesis of colloidal gold. En Hayat MA (editor). *Colloidal Gold: principles, methods and applications*. San Diego, CA: Academic Press 1989, pages 1-33.

Hanna WM, Kwok K. Chromogenic in-situ hybridization: a viable alternative to fluorescence in-situ hybridization in the HER2 testing algorithm. *Mod Pathol*. 2006 Apr;19(4):481-7.

Hansen S, Wiig JN, Giercksky KE et al. Esophageal and gastric carcinoma in Norway 1958-1992: incidence time trend variability according to morphological subtypes and organ subsites. *Int J Cancer* 1997;71:340-344

Hartgrink HH, van de Velde CJ, Putter H et al. Extended lymph node dissection for gastric cancer: who may benefit? Final results of the randomized Dutch gastric cancer group trial. *J Clin Oncol*. 2004 Jun 1;22(11):2069-77.

Hartgrink HH, Jansen EP, van Grieken NC, van de Velde CJ. Gastric cancer. *Lancet*. 2009 Aug 8;374(9688):477-90. Epub 2009 Jul 20.

Helicobacter and Cancer Collaborative Group. Gastric cancer and *Helicobacter pylori*: a combined analysis of 12 case control studies nested within prospective cohorts. *Gut* 2001; 49:347- 353.

Henson DE, Dittus C, Younes M et al. Differential trends in the intestinal and diffuse types of gastric carcinoma in the United States, 1973-2000: increase in the signet ring cell type. *Arch Pathol Lab Med* 2004; 128:765-770.

Hermanek P, Wittekind C. News of TNM and its use for classification of gastric cancer. *World J Surg*. 1995; 19(4):491-5.

Hermans J, Bonenkamp JJ, Boon MC, Bunt AM, Ohyama S, Sasako M, Van de Velde CJ. Adjuvant therapy after curative resection for gastric cancer: meta-analysis of randomized trials. *J Clin Oncol*. 1993 Aug;11(8):1441-7.

Hill MJ. Diet and cancer: a review of scientific evidence. *Eur J Cancer Prev* 1995; 4 (suppl 2):3-42.

Hirohata T, Kono S. Diet/nutrition and stomach cancer in Japan. *Int J Cancer* 1997; (suppl 10):34-36.

Hirota T, Ming SC, Itabashi M. Pathology of Early gastric cancer. En Nishi M, Ichikawa H, Kakajima T et al. *Gastric Cancer*. Tokyo. Springer-Verlag; 1993. Pg 66-86

Hoang MP, Sahin AA, Ordóñez NG, Sneige N. HER-2/neu gene amplification compared with HER-2/neu protein overexpression and interobserver reproducibility in invasive breast carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2000 Jun; 113(6):852-9.

Hofgärtner WT, Thorp M, Ramus MW et al. Gastric adenocarcinoma associated with fundic gland polyps in a patient with attenuated familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol* 1999;94: 2275-2281.

Hofmann M, Stoss O, Shi D, Büttner R, van de Vijver M, Kim W, Ochiai A, Rüschoff J, Henkel T. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology*. 2008 Jun;52(7):797-805. Epub 2008 Apr 18.

Hofmann M, Stoss O, Gaiser T, Kneitz H, Heinmöller P, Gutjahr T, Kaufmann M, Henkel T, Rüschoff J. Central HER2 *IHQ* and FISH analysis in a trastuzumab (Herceptin) phase II monotherapy study: assessment of test sensitivity and impact of chromosome 17 polysomy. *J Clin Pathol*. 2008 Jan;61(1):89-94. Epub 2007 Apr 5.

Hollywood DP, Hurst HC. A novel transcription factor, OB2-1, is required for overexpression of the proto-oncogene c-erbB-2 in mammary tumour lines. *EMBO J*. 1993 Jun;12(6):2369-75.

Howson CP, Hiyama T, Winder EL. The decline in gastric cancer: epidemiology of an unplanned triumph. *Epidemiol Rev* 1986; 8:1-27

Hu JK, Chen ZX, Zhou ZG, Zhang B, Tian J, Chen JP, Wang L, Wang CH, Chen HY, Li YP. Intravenous chemotherapy for resected gastric cancer: meta-analysis of randomized controlled trials. *World J Gastroenterol*. 2002 Dec;8(6):1023-8.

Hua D, Huang ZH, Mao Y, Deng JZ. Thymidylate synthase and thymidine phosphorylase gene expression as predictive parameters for the efficacy of 5-fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2007; 13(37):5030-4.

Huang JQ, Sridhar S, Chen Y, Hunt RH. Meta-analysis of the relationship between *Helicobacter pylori* seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology*. 1998 ; 114:1169-1179.

Hudziak RM, Schlessinger J, Ullrich A. Increased expression of the putative growth factor receptor p185*HER2* causes transformation and tumorigenesis of NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Oct;84(20):7159-63.

Hudziak RM, Lewis GD, Winget M, Fendly BM, Shepard HM, Ullrich A. p185*HER2* monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol*. 1989 Mar;9(3):1165-72.

Hutchison NJ, Langer-Safer PR, Ward DC, Hamkalo BA. *In situ* hybridization at the electron microscope level: hybrid detection by autoradiography and colloidal gold. *J Cell Biol.* 1982 Nov;95(2 Pt 1):609-18.

Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer.* 2005 May;5(5):341-54.

## I

Ichiyoshi Y, Oiwa H, Tomisaki S, Sakaguchi Y, Ohno S, Maehara Y, Sugimachi K. Overexpression of p53 is associated with growth pattern and prognosis in advanced gastric cancer. *Hepatogastroenterology.* 1997; 44(14):546-53

Ikeguchi M, Saito H, Katano K, Gomyo Y, Tsujitani S, Maeta M, Kaibara N. Relationship between the long-term effects of intraperitoneal chemotherapy and the expression of p53 and p21 in patients with gastric carcinoma at stage IIIa and stage IIIb. *Int Surg.* 1997; 82(2):170-4.

Imanaga H, Nakazato H. Results of surgery for gastric cancer and effect of adjuvant mitomycin C on cancer recurrence. *World J Surg.* 1977 (1):213-221.

Inoue M, Tajima K, Kobayashi S et al. Protective factor against progression from atrophic gastritis to gastric cancer--data from a cohort study in Japan. *Int J Cancer.* 1996; 66:309-14.

International Agency for Research on Cancer (IARC). *IARC Monographs on the Evaluation of carcinogenic Risks to Humans, Vol 83: Tobacco Smoke and Involuntary Smoking.* Lion, Francia IARC Press; 2004.

International Agency for Research on Cancer (IARC). *IARC Monographs on the Evaluation of carcinogenic Risks to Humans, Vol 44: Alcohol Drinking.* Lion, Francia IARC Press; 1988.

International Agency for Research on Cancer (IARC). *IARC Monographs on the Evaluation of carcinogenic Risks to Humans, Vol 61: Schistosomes, Liver Flukes and Helicobacter Pylori.* Lion, Francia IARC Press; 1994: 177-240.

International Union against Cancer en Sobin LH, Wittekind Ch. TNM classification of malignant tumors. 6<sup>th</sup> edition. New York, Chichester, Weinhei, Brisbane, Singapur, Toronto. Wiley-Liss Book; 2002.

International Union against Cancer en Sobin LH, Gospodarowicz M, Wittekind Ch. TNM classification of malignant tumors. 7<sup>th</sup> edition. New York, Chichester, Weinhei, Brisbane, Singapur, Toronto. Wiley-Liss Book; 2010.

Inui T, Asakawa A, Morita Y, Mizuno S, Natori T, Kawaguchi A, Murakami M, Hishikawa Y, Inui A. HER-2 overexpression and targeted treatment by trastuzumab in a very old patient with gastric cancer. *J Intern Med*. 2006 Nov;260(5):484-7.

Ishikawa T, Kobayashi M, Mai M, Suzuki T, Ooi A. Amplification of the c-erbB-2 (HER-2/neu) gene in gastric cancer cells. Detection by fluorescence *in situ* hybridization. *Am J Pathol*. 1997 Sep;151(3):761-8.

Isola J, Tanner M, Forsyth A, Cooke TG, Watters AD, Bartlett JM. Interlaboratory comparison of HER-2 oncogene amplification as detected by chromogenic and fluorescence *in situ* hybridization. *Clin Cancer Res*. 2004 Jul 15;10(14):4793-8.

Izumi Y, Xu L, di Tomaso E, Fukumura D, Jain RK. Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. *Nature*. 2002 Mar 21; 416(6878):279-80.

## J

Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ. Comparison of fluorescence *in situ* hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer. *J Clin Oncol*. 1999 Jul; 17(7):1974-82.

Janunger KG, Hafström L, Glimelius B. Chemotherapy in gastric cancer: a review and updated meta-analysis. *Eur J Surg*. 2002; 168(11):597-608.

Japanese Gastric Cancer Association. Japanese classification of Gastric Carcinoma 2<sup>nd</sup> English Edition. *Gastric Cancer* 1998; 1:10-24.

Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, Alanko T, Kataja V, Asola R, Utriainen T, Kokko R, Hemminki A, Tarkkanen M, Turpeenniemi-Hujanen T, Jyrkkiö S, Flander M, Helle L, Ingalsuo S, Johansson K, Jääskeläinen AS, Pajunen M, Rauhala M, Kaleva-Kerola J, Salminen T, Leinonen M, Elomaa I, Isola J; FinHer Study Investigators. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N Engl J Med*. 2006 Feb 23; 354(8):809-20.

## K

Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Kurisu W, Thor A, Chen LC, Smith HS, Waldman FM, Pinkel D, Gray JW. ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence *in situ* hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Jun 15;89(12):5321-5

Kameda T, Yasui W, Yoshida K, Tsujino T, Nakayama H, Ito M, Ito H, Tahara E. Expression of ERBB2 in human gastric carcinomas: relationship between p185ERBB2 expression and the gene amplification. *Cancer Res*. 1990 Dec 15;50(24):8002-9.



Kaneko S, Yoshimura T. Time trend analysis of gastric cancer incidence in Japan by histological types, 1975-1989. *Br J Cancer* 2001; 84:400-405.

Kang YK, Choi dW, Im YH et al. A Phase III randomized comparison of neoadjuvant chemotherapy followed by surgery versus surgery for locally advanced stomach cancer. *Pro Am Soc Clin Oncol, J Clin Oncol* 1996; 15(suppl):215.

Kang Y-K, Kang W-K, Shin D-B, Chen J, Xiong J, Wang J, LichinitserM, Guan Z, Khasanov R, Zheng L, Philco-Salas M, Suarez T, Santamaria J, Forster G, and McCloud PI. Capecitabine/cisplatin versus 5-fluorouracil/cisplatin as first-line therapy in patients with advanced gastric cancer: a randomised phase III noninferiority trial. *Ann Oncol* 2009 20 (4): 666-673.

Kanta SY, Yamane T, Dobashi Y, Mitsui F, Kono K, Ooi A. Topoisomerase IIalpha gene amplification in gastric carcinomas: correlation with the HER2 gene. An immunohistochemical, immunoblotting, and multicolor fluorescence *in situ* hybridization study. *Hum Pathol.* 2006 Oct;37(10):1333-43. Epub 2006 Aug 10

Kasprzyk PG, Song SU, Di Fiore PP, King CR. Therapy of an animal model of human gastric cancer using a combination of anti-erbB-2 monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 1992 May 15;52(10):2771-6.

Kato S, Onda M, Matsukura N et al. Helicobacter pylori infection and genetic polymorphisms for cancer-related genes in gastric carcinogenesis. *Biomed Pharmacother.* 1997; 51:145-149.

Kavanagh DO, Chambers G, O'Grady L, Barry KM, Waldron RP, Bennani F, Eustace PW, Tobbia I. Is overexpression of HER-2 a predictor of prognosis in colorectal cancer? *BMC Cancer.* 2009 Jan 1; 9:1.

Kelsen D, Atiq OT, Saltz L, Niedzwiecki D, Ginn D, Chapman D, Heelan R, Lightdale C, Vinciguerra V, Brennan M. FAMTX versus etoposide, doxorubicin, and cisplatin: a random assignment trial in gastric cancer. *J Clin Oncol.* 1992 Apr;10(4):541-8.

Kelsen D, Jhawer M, Ilson D, Tse A, Randazzo J, Robinson E, Capanu M, Shah MA. Analysis of survival with modified docetaxel, cisplatin, fluorouracil (mDCF), and bevacizumab (BEV) in patients with metastatic gastroesophageal (GE) adenocarcinoma: Results of a phase II clinical trial. *J Clin Oncol* 27:15s, 2009 (suppl; abstr 4512).

Kikuchi S, AGhigara O, Hasegawa A et al. Seroconversion and seroreversion of Helicobacter pylori antibodies over a 9-year period and related factors in Japanese adults. *Helicobacter* 2004; 9:335-341.

Kim GY, Oh YL. Chromogenic *in situ* hybridization analysis of HER-2/neu status in cytological samples of breast carcinoma. *Cytopathology*. 2004 Dec; 15(6):315-20.

Kim JJ, Lee JH, Jung HY, Lee GH, Cho JY, Ryu CB, Chun HJ, Park JJ, Lee WS, Kim HS, Chung MG, Moon JS, Choi SR, Song GA, Jeong HY, Jee SR, Seol SY, Yoon YB. EMR for early gastric cancer in Korea: a multicenter retrospective study. *Gastrointest Endosc*. 2007 Oct; 66(4):693-700.

Kim JJ, Song Ky, Hur H et al. Lymph node micrometastases in node negative early gastric cancer. *EJSO (The Journal of Cancer Surgery)* 2008; 1,1-6.

Kim JP, Oh ST, Hwang TS, Chi JG. The prognostic significance of c-erbB-2 and p53 protein expressions in gastric carcinoma--a multivariate analysis of prognostic factors. *J Korean Med Sci*. 1994 Jun;9(3):248-53.

Kim JW, Kim HP, Im SA, Kang S, Hur HS, Yoon YK, Oh DY, Kim JH, Lee DS, Kim TY, Bang YJ. The growth inhibitory effect of lapatinib, a dual inhibitor of EGFR and HER2 tyrosine kinase, in gastric cancer cell lines. *Cancer Lett*. 2008 Dec 18;272(2):296-306. Epub 2008 Sep 6.

Kim NK, Park YS, Heo DS, Suh C, Kim SY, Park KC, Kang YK, Shin DB, Kim HT, Kim HJ, et al. A phase III randomized study of 5-fluorouracil and cisplatin versus 5-fluorouracil, doxorubicin, and mitomycin C versus 5-fluorouracil alone in the treatment of advanced gastric cancer. *Cancer*. 1993 Jun 15; 71(12):3813-8.

Kim S, Lim DH, Lee J, Kang WK, MacDonald JS, Park CH, Park SH, Lee SH, Kim K, Park JO, Kim WS, Jung CW, Park YS, Im YH, Sohn TS, Noh JH, Heo JS, Kim YI, Park CK, Park K. An observational study suggesting clinical benefit for adjuvant postoperative chemoradiation in a population of over 500 cases after gastric resection with D2 nodal dissection for adenocarcinoma of the stomach. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005 Dec 1; 63(5):1279-85.

Kim SY, Kim HP, Kim YJ, Oh do Y, Im SA, Lee D, Jong HS, Kim TY, Bang YJ. Trastuzumab inhibits the growth of human gastric cancer cell lines with HER2 amplification synergistically with cisplatin. *Int J Oncol*. 2008 Jan;32(1):89-95.

King CR, Kraus MH, Aaronson SA. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science*. 1985 Sep 6; 229(4717):974-6.

Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87:159-170.

Kodera Y, Ito S, Mochizuki Y, Fujitake S, Koshikawa K, Kanyama Y, Matsui T, Kojima H, Takase T, Ohashi N, Fujiwara M, Sakamoto J, Akimasa N; Chubu Clinical Cancer Group. A phase II study of weekly paclitaxel as second-line chemotherapy for advanced gastric Cancer (CCOG0302 study). *Anticancer Res.* 2007 Jul-Aug; 27(4C):2667-71.

Kollmannsberger C, Quietzsch D, Haag C, Lingenfelser T, Schroeder M, Hartmann JT, Baronius W, Hempel V, Clemens M, Kanz L, Bokemeyer C. A phase II study of paclitaxel, weekly, 24-hour continuous infusion 5-fluorouracil, folinic acid and cisplatin in patients with advanced gastric cancer. *Br J Cancer.* 2000 Aug; 83(4):458-62.

Konecny G, Pauletti G, Pegram M, Untch M, Dandekar S, Aguilar Z, Wilson C, Rong HM, Bauerfeind I, Felber M, Wang HJ, Beryt M, Seshadri R, Hepp H, Slamon DJ. Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2003 Jan 15; 95(2):142-53.

Krämling HJ, Wilkowski R, Dühmke E, Cramer C, Willich N, Schildberg FW. Adjuvant intraoperative radiotherapy of stomach carcinoma. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd.* 1996; 113:211-3.

Kuipers EJ, Pérez-Pérez GI, Meuwissen SG et al. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the *cagA* status. *J Natl Cancer Inst.* 1995; 87:1777-1780.

## L

La Vecchia C, Negri F, Francesch S et al. Family history and the risk of stomach and colorectal cancers. *Cancer* 1992; 70:50-55.

Laakso M, Tanner M, Isola J. Dual-colour chromogenic *in situ* hybridization for testing of HER-2 oncogene amplification in archival breast tumours. *J Pathol.* 2006 Sep; 210(1):3-9.

Lacroix-Triki M, Mounie E, Charafe-Jauffret E et al. Double staining chromogenic *in situ* hybridization is a useful alternative to fluorescent *in situ* hybridization: first comparative study of HER2 and TOP2A gene amplification in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2007; 106 (suppl 1): S85-S86, abstract 2006.

Laé M, Couturier J, Oudard S, Radvanyi F, Beuzeboc P, Vieillefond A. Assessing HER2 gene amplification as a potential target for therapy in invasive urothelial bladder cancer with a standardized methodology: results in 1005 patients. *Ann Oncol.* 2010 Apr;21(4):815-9. Epub 2009 Nov 4.

Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. an attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1965; 64:31-49.

Lauren PA, Nevalainen TJ. Epidemiology of intestinal and diffuse types of gastric carcinoma. A time-trend study in Finland with comparison between studies from high- and low-risk areas. *Cancer* 1993;71: 2926-2933.

Lee EY, Cibull ML, Strodel WE, Haley JV. Expression of HER-2/neu oncoprotein and epidermal growth factor receptor and prognosis in gastric carcinoma. *Arch Pathol Lab Med*. 1994 Mar;118(3):235-9.

Lee HE, Chae SW, Lee YJ, Kim MA, Lee HS, Lee BL, Kim WH. Prognostic implications of type and density of tumour-infiltrating lymphocytes in gastric cancer. *Br J Cancer*. 2008 Nov 18; 99(10):1704-11.

Lee HR, Kim JH, Uhm HD, Ahn JB, Rha SY, Cho JY, Lee JI, Lee KH, Chung HC, Roh JK, Min JS, Lee KS, Shin DH, Kim BS, Hong SW, Choi JH. Overexpression of c-ErbB-2 protein in gastric cancer by immunohistochemical stain. *Oncology*. 1996 May-Jun;53(3):192-7.

Lee KE, Lee HJ, Kim YH, Yu HJ, Yang HK, Kim WH, Lee KU, Choe KJ, Kim JP. Prognostic significance of p53, nm23, PCNA and c-erbB-2 in gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2003 Apr;33(4):173-9.

Leichman L, Silberman H, Leichman CG, Spears CP, Ray M, Muggia FM, Kiyabu M, Radin R, Laine L, Stain S, et al. Preoperative systemic chemotherapy followed by adjuvant postoperative intraperitoneal therapy for gastric cancer: a University of Southern California pilot program. *J Clin Oncol*. 1992 Dec;10(12):1933-42.

Lemoine NR, Jain S, Silvestre F, Lopes C, Hughes CM, McLelland E, Gullick WJ, Filipe MI. Amplification and overexpression of the EGF receptor and c-erbB-2 proto-oncogenes in human stomach cancer. *Br J Cancer*. 1991 Jul;64(1):79-83.

Lenz HJ, Leichman CG, Danenberg KD, Danenberg PV, Groshen S, Cohen H, Laine L, Crookes P, Silberman H, Baranda J, Garcia Y, Li J, Leichman L. Thymidylate synthase mRNA level in adenocarcinoma of the stomach: a predictor for primary tumor response and overall survival. *J Clin Oncol*. 1996; 14(1):176-82.

Levi JA, Fox RM, Tattersall MH, Woods RL, Thomson D, Gill G. Analysis of a prospectively randomized comparison of doxorubicin versus 5-fluorouracil, doxorubicin, and BCNU in advanced gastric cancer: implications for future studies. *J Clin Oncol*. 1986 Sep; 4(9):1348-55.

Lin JT, Wu MS, Shun CT, Lee WJ, Sheu JC, Wang TH. Occurrence of microsatellite instability in gastric carcinoma is associated with enhanced expression of erbB-2 oncoprotein. *Cancer Res*. 1995 Apr 1;55(7):1428-30.

Liu Y, Kaneko S, Sobue T. Trends in reported incidences of gastric cancer by tumor location, from 1975 to 1989 in Japan. *Int J Epidemiol* 2004;33:808-815.

Lo SS, KuoHS, Wu CW et al. Poorer prognosis in Young patients with gastric cancer? *Hepatogastroenterology* 1999; 46:2690-2693.

Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3(5):330-8.

Longva KE, Pedersen NM, Haslekås C, Stang E, Madshus IH. Herceptin-induced inhibition of ErbB2 signaling involves reduced phosphorylation of Akt but not endocytic down-regulation of ErbB2. *Int J Cancer*. 2005 Sep 1;116(3):359-67.

Lordick F, Lorenzen S, Hegewisch-Becker S, Folprecht G, Wöll E, Decker T, Endlicher E, Röthling E, Fend F, Peschel C. Cetuximab plus weekly oxaliplatin/5-Fu/FA (FUFOX) in 1st line metastatic gastric cancer. Final results from a multicenter phase II study of the AIO upper GI study group. *Journal of Clinical Oncology*, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 25, No. 18S (June 20 Supplement), 2007: 4526.

Lordick F, Schulze T, Jager D. The role of biologics in stomach cancer. *Targ Oncol* 2008; 3:71-79.

Loring P, Cummins R, O'Grady A, Kay EW. HER2 positivity in breast carcinoma: a comparison of chromogenic *in situ* hybridization with fluorescence *in situ* hybridization in tissue microarrays, with targeted evaluation of intratumoral heterogeneity by *in situ* hybridization. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2005 Jun;13(2):194-200.

Lottner C, Schwarz S, Diermeier S, Hartmann A, Knuechel R, Hofstaedter F, Brockhoff G. Simultaneous detection of HER2/neu gene amplification and protein overexpression in paraffin-embedded breast cancer. *J Pathol*. 2005 Apr;205(5):577-84.

Lu Y, Zi X, Zhao Y, Mascarenhas D, Pollak M. Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin). *J Natl Cancer Inst*. 2001 Dec 19; 93(24):1852-7.

## M

Ma Y, Lespagnard L, Durbecq V, Paesmans M, Desmedt C, Gomez-Galdon M, Veys I, Cardoso F, Sotiriou C, Di Leo A, Piccart MJ, Larsimont D. Polysomy 17 in HER-2/neu status elaboration in breast cancer: effect on daily practice. *Clin Cancer Res*. 2005 Jun 15; 11(12):4393-9.

Macdonald JS, Smalley SR, Benedetti J, Hundahl SA, Estes NC, Stemmermann GN, Haller DG, Ajani JA, Gunderson LL, Jessup JM, Martenson JA. Chemoradiotherapy after surgery

compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. *N Engl J Med*. 2001 Sep 6; 345(10):725-30.

Machado JC, Oliveira C, Carvalho R, Soares P, Berx G, Caldas C, Seruca R, Carneiro F, Sobrinho-Simões M. E-cadherin gene (CDH1) promoter methylation as the second hit in sporadic diffuse gastric carcinoma. *Oncogene*. 2001; 20(12):1525-8.

Maeda K, Chung YS, Ogawa Y, Takatsuka S, Kang SM, Ogawa M, Sawada T, Sowa M. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer*. 1996; 77(5):858-63.

Maehara Y, Kakeji Y, Oda S, Takahashi I, Akazawa K, Sugimachi K. Time trends of surgical treatment and the prognosis for Japanese patients with gastric cancer. *Br J Cancer*. 2000; 83(8):986-91.

Maehara Y, Kusumoto T, Takahashi I, Kakeji Y, Baba H, Akazawa K, Sugimachi K. Predictive value of preoperative carcinoembryonic antigen levels for the prognosis of patients with well-differentiated gastric cancer. A multivariate analysis. *Oncology*. 1994; 51(3):234-7

Maehara Y, Watanabe A, Kakeji Y, Emi Y, Moriguchi S, Anai H, Sugimachi K. Prognosis for surgically treated gastric cancer patients is poorer for women than men in all patients under age 50. *Br J Cancer*. 1992; 65(3):417-20.

Maguire A, Porta M, Sanz-Anquela JM et al. Sex as a prognostic factor in gastric cancer. *Eur J Cancer* 1996; 32A:1303-1309.

Mannick EE, Bravo LE, Zarama G et al. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: effect of antibiotics and antioxidants. *Cancer Res* 1996; 56:3238-3243.

Mari E, Floriani I, Tinazzi A, Buda A, Belfiglio M, Valentini M, Cascinu S, Barni S, Labianca R, Torri V. Efficacy of adjuvant chemotherapy after curative resection for gastric cancer: a meta-analysis of published randomised trials. A study of the GISCAD (Gruppo Italiano per lo Studio dei Carcinomi dell'Apparato Digerente). *Ann Oncol*. 2000 Jul;11(7):837-43.

Marty M, Cognetti F, Maraninchi D, Snyder R, Mauriac L, Tubiana-Hulin M, Chan S, Grimes D, Antón A, Lluch A, Kennedy J, O'Byrne K, Conte P, Green M, Ward C, Mayne K, Extra JM. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group. *J Clin Oncol*. 2005 Jul 1;23(19):4265-74. Epub 2005 May 23.

Maruyama K, Sasako M, Kinoshita T, Sano T, Katai H. Surgical treatment for gastric cancer: the Japanese approach. *Semin Oncol*. 1996; 23(3):360-8.

Marx AH, Tharun L, Muth J, Dancau AM, Simon R, Yekebas E, Kaifi JT, Mirlacher M, Brümmendorf TH, Bokemeyer C, Izbicki JR, Sauter G. HER-2 amplification is highly homogenous in gastric cancer. *Hum Pathol*. 2009 Jun;40(6):769-77. Epub 2009 Mar 9.

Masood S, Bui MM. Prognostic and predictive value of HER2/neu oncogene in breast cancer. *Microsc Res Tech*. 2002 Oct 15; 59(2):102-8.

Mass RD, Press MF, Anderson S, Cobleigh MA, Vogel CL, Dybdal N, Leiberman G, Slamon DJ. Evaluation of clinical outcomes according to *HER2* detection by fluorescence *in situ* hybridization in women with metastatic breast cancer treated with trastuzumab. *Clin Breast Cancer*. 2005 Aug;6(3):240-6.

Matsui Y, Inomata M, Tojigamori M, Sonoda K, Shiraishi N, Kitano S. Suppression of tumor growth in human gastric cancer with HER2 overexpression by an anti-HER2 antibody in a murine model. *Int J Oncol*. 2005 Sep;27(3):681-5.

McCulloch PG, Ochiai A, O'Dowd GM, Nash JR, Sasako M, Hirohashi S. Comparison of the molecular genetics of c-erb-B2 and p53 expression in stomach cancer in Britain and Japan. *Cancer*. 1995 Feb 15;75(4):920-5.

Metzger R, Leichman CG, Danenberg KD, Danenberg PV, Lenz HJ, Hayashi K, Groshen S, Salonga D, Cohen H, Laine L, Crookes P, Silberman H, Baranda J, Konda B, Leichman L. ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy. *Clin Oncol*. 1998; 16(1):309-16.

Ming SC. Gastric carcinoma. A pathobiological classification. *Cancer* 1977 Jun;39(6):2475-85.

Mittendorf EA, Wu Y, Scaltriti M, Meric-Bernstam F, Hunt KK, Dawood S, Esteva FJ, Buzdar AU, Chen H, Eksambi S, Hortobagyi GN, Baselga J, Gonzalez-Angulo AM. Loss of *HER2* amplification following trastuzumab-based neoadjuvant systemic therapy and survival outcomes. *Clin Cancer Res*. 2009 Dec 1;15(23):7381-8. Epub 2009 Nov 17

Mizutani T, Onda M, Tokunaga A, Yamanaka N, Sugisaki Y. Relationship of C-erbB-2 protein expression and gene amplification to invasion and metastasis in human gastric cancer. *Cancer*. 1993 Oct 1;72(7):2083-8.

Moasser MM. The oncogene *HER2*: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*. 2007 Oct 4;26(45):6469-87. Epub 2007 Apr 30.

Moertel CG, Childs DS, O'Fallon JR, Holbrook MA, Schutt AJ, Reitemeier RJ. Combined 5-fluorouracil and radiation therapy as a surgical adjuvant for poor prognosis gastric carcinoma. *J Clin Oncol*. 1984; 2(11):1249-54.

Molina MA, Codony-Servat J, Albanell J, Rojo F, Arribas J, Baselga J. Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-*HER2* receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated *HER2* ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res*. 2001 Jun 15;61(12):4744-9.

Mönig SP, Baldus SE, Hennecken JK, Spiecker DB, Grass G, Schneider PM, Thiele J, Dienes HP, Hölscher AH. Expression of MMP-2 is associated with progression and lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Histopathology*. 2001; 39(6):597-602.

Montemurro F, Valabrega G, Aglietta M. Trastuzumab-based combination therapy for breast cancer. *Expert Opin Pharmacother*. 2004 Jan;5(1):81-96.

Moody SE, Sarkisian CJ, Hahn KT, Gunther EJ, Pickup S, Dugan KD, Innocent N, Cardiff RD, Schnall MD, Chodosh LA. Conditional activation of Neu in the mammary epithelium of transgenic mice results in reversible pulmonary metastasis. *Cancer Cell*. 2002 Dec;2(6):451-61.

Muñoz N. Descriptive epidemiology of Stomach Cancer en *Gastric Carcinogenesis*, Reed PI, Hill MJ (eds). Excerpta Medica: Amsterdam, New York, Oxford. 1988.

Murad AM, Santiago FF, Petroianu A, Rocha PR, Rodrigues MA, Rausch M. Modified therapy with 5-fluorouracil, doxorubicin, and methotrexate in advanced gastric cancer. *Cancer*. 1993 Jul 1;72(1):37-41

Murakami T. Pathomorphological diagnosis. Definition and gross classification or early gastric cáncer. *Gann Monogr* 1971; 11:53-55.

Musolino A, Naldi N, Bortesi B, Pezzuolo D, Capelletti M, Missale G, Laccabue D, Zerbini A, Camisa R, Bisagni G, Neri TM, Ardizzoni A. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Apr 10;26(11):1789-96. Epub 2008 Mar 17.

## N

Nagai MA, Pacheco MM, Oshima CT, Brentani MM. c-erbB-2 DNA amplification and mRNA expression in human primary breast tumors and its relationship to other prognostic factors. *Cancer Biother*. 1993 Spring; 8(1):29-35.



Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, Klos KS, Li P, Monia BP, Nguyen NT, Hortobagyi GN, Hung MC, Yu D. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell*. 2004 Aug;6(2):117-27.

Nahta R, Yuan LX, Zhang B, Kobayashi R, Esteva FJ. Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells. *Cancer Res*. 2005 Dec 1;65(23):11118-28.

Nakajima M, Sawada H, Yamada Y, Watanabe A, Tatsumi M, Yamashita J, Matsuda M, Sakaguchi T, Hirao T, Nakano H. The prognostic significance of amplification and overexpression of c-met and c-erb B-2 in human gastric carcinomas. *Cancer*. 1999 May 1;85(9):1894-902.

Nakajima T. Gastric cancer treatment guidelines in Japan. *Gastric Cancer*. 2002; 5(1):1-5.

Nakata B, Chung KH, Ogawa M, Ogawa Y, Yanagawa K, Muguruma K, Inoue T, Yamashita Y, Onoda N, Maeda K, Sawada T, Sowa M. p53 protein overexpression as a predictor of the response to chemotherapy in gastric cancer. *Surg Today*. 1998; 28(6):595-8.

Neri B, de Leonardis V, Romano S, Andreoli F, Pernice LM, Bruno L, Borrelli D, Valeri A, Fabbroni S, Intini C, Cini G. Adjuvant chemotherapy after gastric resection in node-positive cancer patients: a multicentre randomised study. *Br J Cancer*. 1996; 73(4):549-52.

Nicholas G, Cripps C, Heather-Jane A et al. Early results of a trial of trastuzumab, cisplatin and docetaxel (TCD) for the treatment of metastatic gastric cancer overexpressing HER2. *Ann Oncol* 2006; 17(suppl 9):316 (abstract 1105P).

Nishiyama M, Takashima I, Tanaka T, Yoshida K, Toge T, Nagata N, Iwamori S, Tamura Y. Carcinoembryonic antigen levels in the peritoneal cavity: useful guide to peritoneal recurrence and prognosis for gastric cancer. *World J Surg*. 1995; 19(1):133-7.

Nitta H, Hauss-Wegrzyniak B, Lehrkamp M, Murillo AE, Gaire F, Farrell M, Walk E, Penault-Llorca F, Kurosumi M, Dietel M, Wang L, Loftus M, Pettay J, Tubbs RR, Grogan TM. Development of automated brightfield double *In situ* hybridization (BDISH) application for HER2 gene and chromosome 17 centromere (CEN 17) for breast carcinomas and an assay performance comparison to manual dual color HER2 fluorescence *In situ* hybridization (FISH). *Diagn Pathol*. 2008 Oct 22;3:41.

Nomura H, Sato H, Seiki M, Mai M, Okada Y. Expression of membrane-type matrix metalloproteinase in human gastric carcinomas. *Cancer Res*. 1995 ; 55(15):3263-6.

**O**

Ocean J, Schnoll-Sussman F, Chen XE, Keresztes R, Holloway S, Matthews K, O'Brien N, Christos P, Mazumdar M, Wadler S. Recent results of phase II study of PS-341 (bortezomib) with or without irinotecan in patients (pts) with advanced gastric adenocarcinomas (AGA). 2007 Gastrointestinal Cancers Symposium. Abstract 45.

Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J*. 2000 Jul 3; 19(13):3159-67.

Ooi A, Kobayashi M, Mai M, Nakanishi I. Amplification of c-erbB-2 in gastric cancer: detection in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue by fluorescence *in situ* hybridization. *Lab Invest*. 1998 Mar;78(3):345-51.

Ooi A, Takehana T, Li X, Suzuki S, Kunitomo K, Iino H, Fujii H, Takeda Y, Dobashi Y. Protein overexpression and gene amplification of HER-2 and EGFR in colorectal cancers: an immunohistochemical and fluorescent *in situ* hybridization study. *Mod Pathol*. 2004 Aug;17(8):895-904.

Orita H, Maehara Y, Emi Y, Kakeji Y, Baba H, Korenaga D, Sugimachi K. c-erbB-2 expression is predictive for lymphatic spread of clinical gastric carcinoma. *Hepatogastroenterology*. 1997 Jan-Feb;44(13):294-8.

Ougolkov A, Mai M, Takahashi Y, Omote K, Bilim V, Shimizu A, Minamoto T. Altered expression of beta-catenin and c-erbB-2 in early gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2000 Sep;19(3):349-55.

Ougolkov A, Yamashita K, Bilim V, Takahashi Y, Mai M, Minamoto T. Abnormal expression of E-cadherin, beta-catenin, and c-erbB-2 in advanced gastric cancer: its association with liver metastasis. *Int J Colorectal Dis*. 2003 Mar;18(2):160-6. Epub 2002 Aug 10.

Owens MA, Horten BC, Da Silva MM. HER2 amplification ratios by fluorescence *in situ* hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. *Clin Breast Cancer*. 2004 Apr; 5(1):63-9.

**P**

Paik S, Bryant J, Park C, Fisher B, Tan-Chiu E, Hyams D, Fisher ER, Lippman ME, Wickerham DL, Wolmark N. erbB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1998 Sep 16; 90(18):1361-70.

Paik S, Park C. HER-2 and choice of adjuvant chemotherapy in breast cancer. *Semin Oncol*. 2001 Aug; 28(4):332-5.

Palacios J, Andreu X, Calasanz MJ, Concha A, Corominas JM, García-Caballero T, López JA, López-Ríos F, Ramón y Cajal S, Vera-Sempere FJ, Colomer R, Martín M, Alba E, González-Martín A, Llombart A, Lluch A, Albanell J. Guidelines for HER2 testing in breast cancer: a national consensus of the Spanish Society of Pathology (SEAP) and the Spanish Society of Medical Oncology (SEOM). *Rev Esp Patol* 2009; 42:3-16.

Panani AD. Cytogenetic and molecular aspects of gastric cancer: clinical implications. *Cancer Lett.* 2008 Aug 8;266(2):99-115. Epub 2008 Apr 1.

Panzini I, Gianni L, Fattori PP, Tassinari D, Imola M, Fabbri P, Arcangeli V, Drudi G, Canuti D, Fochessati F, Ravaioli A. Adjuvant chemotherapy in gastric cancer: a meta-analysis of randomized trials and a comparison with previous meta-analyses. *Tumori.* 2002; 88(1):21-7.

Papouchado BG, Myles J, Lloyd RV. Silver *In situ* Hybridization (SISH) For Determination of HER2 Gene Status in Breast Carcinoma: Comparison With FISH and Assessment of Interobserver Reproducibility. *Am J Surg Pathol* 2010 (en impression).).

Park DI, Kang MS, Oh SJ, Kim HJ, Cho YK, Sohn CI, Jeon WK, Kim BI, Han WK, Kim H, Ryu SH, Sepulveda AR. HER-2/neu overexpression is an independent prognostic factor in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis.* 2007 May;22(5):491-7. Epub 2006 Sep 1.

Park DI, Yun JW, Park JH, Oh SJ, Kim HJ, Cho YK, Sohn CI, Jeon WK, Kim BI, Yoo CH, Son BH, Cho EY, Chae SW, Kim EJ, Sohn JH, Ryu SH, Sepulveda AR. HER-2/neu amplification is an independent prognostic factor in gastric cancer. *Dig Dis Sci.* 2006 Aug;51(8):1371-9. Epub 2006 Jul 26.

Park JW, Tripathy D, Campbell MJ et al. Biological Therapy of Breast Cancer. *Biodrugs* 2000; 14: 221-246.

Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2001; 2:533-543.

Parkin DM. International Variation. *Oncogene* 2004;23:6329-6340

Parsonnet J. The incidence of Helicobacter Pylori infection. *Aliment Pharmacol Ther* 1995; 9 (Supl 29): 45-51

Patel NM, Nozaki S, Shortle NH, Bhat-Nakshatri P, Newton TR, Rice S, Gelfanov V, Boswell SH, Goulet RJ Jr, Sledge GW Jr, Nakshatri H. Paclitaxel sensitivity of breast cancer cells with constitutively active NF-kappaB is enhanced by IkappaBalpha super-repressor and parthenolide. *Oncogene.* 2000; 19(36):4159-69.

Pauletti G, Dandekar S, Rong H, Ramos L, Peng H, Seshadri R, Slamon DJ. Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence *in situ* hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol*. 2000 Nov 1;18(21):3651-64.

Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ. Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence *in situ* hybridization. *Oncogene*. 1996 Jul 4; 13(1):63-72.

Pedersen M, Rasmussen BB. The correlation between dual-color chromogenic *in situ* hybridization and fluorescence *in situ* hybridization in assessing HER2 gene amplification in breast cancer. *Diagn Mol Pathol*. 2009 Jun;18(2):96-102.

Peinert S, Arnold D, Siewczynski R, Kegel T, Heider C, Nietsch H, Schmoll H. BECAM: A salvage protocol with bevacizumab, capecitabin, and mitomycin C for patients with refractory metastatic colorectal cancer (CRC) or gastric cancer (GC). *Journal of Clinical Oncology*, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 24, No. 18S (June 20 Supplement), 2006: 13554.

Penault-Llorca F, Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Osamura RY, Rüschoff J, van de Vijver M. Emerging technologies for assessing HER2 amplification. *Am J Clin Pathol*. 2009 Oct;132(4):539-48.

Penault-Llorca F, Vincent-Salomon A, Mathieu MC, Trillet-Lenoir V, Khayat D, Marty M On Behalf Of The Esther Study Group. Incidence and implications of HER2 and hormonal receptor overexpression in newly diagnosed metastatic breast cancer (MBC). *Journal of Clinical Oncology*, 2005 ASCO Annual Meeting Proceedings. Vol 23, No. 16S, Part I of II (June 1 Supplement), 2005: 764

Perez EA, Suman VJ, Davidson NE, Martino S, Kaufman PA, Lingle WL, Flynn PJ, Ingle JN, Visscher D, Jenkins RB. HER2 testing by local, central, and reference laboratories in specimens from the North Central Cancer Treatment Group N9831 intergroup adjuvant trial. *J Clin Oncol*. 2006 Jul 1;24(19):3032-8.

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747-52

Phillips KA, Marshall DA, Haas JS, Elkin EB, Liang SY, Hassett MJ, Ferrusi I, Brock JE, Van Bebber SL. Clinical practice patterns and cost effectiveness of human epidermal growth receptor 2 testing strategies in breast cancer patients. *Cancer*. 2009 Nov 15;115(22):5166-74.

Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C, Cameron D, Dowsett M, Barrios CH, Steger G, Huang CS, Andersson M, Inbar M, Lichinitser M, Láng I, Nitz U, Iwata H, Thomssen C, Lohrisch C, Suter TM, Rüschoff J, Suto T, Grotzer V, Ward C, Straehle C, McFadden E, Dolci MS, Gelber RD; Herceptin Adjuvant (HERA) Trial Study Team. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in *HER2*-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005 Oct 20;353(16):1659-72.

Pignatelli B, Bancel B, Plummer M et al. Helicobacter Pylori eradication attenuates oxidative stress in Human Gastric mucosa. *AM J Gastroenterol* 2001; 96:1758-1766.

Pinto C, Di Fabio F, Siena S, Cascinu S, Rojas Llimpe FL, Ceccarelli C, Mutri V, Giannetta L, Giaquinta S, Funaioli C, Berardi R, Longobardi C, Piana E, Martoni AA. Phase II study of cetuximab in combination with FOLFIRI in patients with untreated advanced gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma (FOLCETUX study). *Ann Oncol*. 2007; 18(3):510-7.

Pinto C, Di Fabio F, Barone C, Siena S, Falcone A, Rojas Llimpe FL, Cascinu S, Giaquinta S, Schinzari G, Mutri V, Martoni AA. Cetuximab in combination with cisplatin and docetaxel as first-line treatment in patients with locally advanced or metastatic gastric or gastroesophageal junction (GEJ) adenocarcinoma (Italian phase II DOCETUX study). *J Clin Oncol* 26: 2008 (May 20 suppl; abstr 4575).

Pinto-de-Sousa J, David L, Almeida R, Leitão D, Preto JR, Seixas M, Pimenta A. c-erb B-2 expression is associated with tumor location and venous invasion and influences survival of patients with gastric carcinoma. *Int J Surg Pathol*. 2002 Oct;10(4):247-56.

Polkowski W, van Sandick JW, Offerhaus GJ, ten Kate FJ, Mulder J, Obertop H, van Lanschot JJ. Prognostic value of Laurén classification and c-erbB-2 oncogene overexpression in adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. *Ann Surg Oncol*. 1999 Apr-May;6(3):290-7.

Polyzos A, Tsavaris N, Kosmas C, Polyzos K, Giannopoulos A, Felekouras E, Nikiteas N, Kouraklis G, Griniatsos J, Safioleas M, Stamatakis M, Pikoulis E, Papachristodoulou A, Gogas H. Subsets of patients with advanced gastric cancer responding to second-line chemotherapy with docetaxel-cisplatin. *Anticancer Res*. 2006; 26(5B):3749-53.

Porebska I, Harlozińska A, Bojarowski T. Expression of the tyrosine kinase activity growth factor receptors (EGFR, ERB B2, ERB B3) in colorectal adenocarcinomas and adenomas. *Tumour Biol*. 2000 Mar-Apr;21(2):105-15.

Powell RD, Pettay JD, Powell WC, Roche PC, Grogan TM, Hainfeld JF, Tubbs RR. Metallographic *in situ* hybridization. *Hum Pathol*. 2007 Aug;38(8):1145-59.

Press MF, Sauter G, Bernstein L, Villalobos IE, Mirlacher M, Zhou JY, Wardeh R, Li YT, Guzman R, Ma Y, Sullivan-Halley J, Santiago A, Park JM, Riva A, Slamon DJ. Diagnostic evaluation of HER-2 as a molecular target: an assessment of accuracy and reproducibility of laboratory testing in large, prospective, randomized clinical trials. *Clin Cancer Res*. 2005 Sep 15;11(18):6598-607.

## R

Rebischung C, Barnoud R, Stéfani L, Faucheron JL, Mousseau M. The effectiveness of trastuzumab (Herceptin) combined with chemotherapy for gastric carcinoma with overexpression of the c-erbB-2 protein. *Gastric Cancer*. 2005;8(4):249-52.

Rech J, Arnld D, Folprecht G et al. A pilot study of Trastuzumab monotherapy in patients who progressed while on chemotherapy for metastatic or locally advanced HER positive gastric cancer. *Ann Oncol* 2006; 17(suppl 9):314 (abstract 1096P).

Renkonen-Sinisalo L, Sipponen P, Aarnio M et al. No support for endoscopic surveillance for gastric cancer in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37:574-577.

Rhyu MG, Park WS, Meltzer SJ. Microsatellite instability occurs frequently in human gastric carcinoma. *Oncogene*. 1994; 9(1):29-32.

Risio M, De Rosa G, Sarotto I, Casorzo L, Capussotti L, Torchio B, Aglietta M, Chiecchio L. HER2 testing in gastric cancer: molecular morphology and storage time-related changes in archival samples. *Int J Oncol*. 2003 Nov;23(5):1381-7.

Robertson CS, Chung SC, Woods SD, Griffin SM, Raimes SA, Lau JT, Li AK. A prospective randomized trial comparing R1 subtotal gastrectomy with R3 total gastrectomy for antral cancer. *Ann Surg*. 1994; 220(2):176-82.

Roh JK, Pik S, Chun HC et al. Overexpression of erbB-2 protein in gastric adenocarcinoma: a potential role in therapeutic response to adjuvant 5-Fu-doxorubicin regimen. *Jpn J Cancer Chemo*. 1992; 19:1207-1219.

Rojo F, Tabernero J, Albanell J, Van Cutsem E, Ohtsu A, Doi T, Koizumi W, Shirao K, Takiuchi H, Ramon y Cajal S, Baselga J. Pharmacodynamic studies of gefitinib in tumor biopsy specimens from patients with advanced gastric carcinoma. *J Clin Oncol*. 2006; 24(26):4309-16.

Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE Jr, Davidson NE, Tan-Chiu E, Martino S, Paik S, Kaufman PA, Swain SM, Pisansky TM, Fehrenbacher L, Kutteh LA, Vogel VG, Visscher DW, Yothers G, Jenkins RB, Brown AM, Dakhil SR, Mamounas EP, Lingle WL, Klein PM, Ingle JN, Wolmark N. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable *HER2*-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005 Oct 20;353(16):1673-84.

Ross JS, Sheehan C, Hayner-Buchan AM, Ambros RA, Kallakury BV, Kaufman R, Fisher HA, Muraca PJ. HER-2/neu gene amplification status in prostate cancer by fluorescence *in situ* hybridization. *Hum Pathol*. 1997 Jul;28(7):827-33.

Ross JS, Fletcher JA. HER-2/neu (c-erb-B2) gene and protein in breast cancer. *Am J Clin Pathol*. 1999 Jul;112(1 Suppl 1):S53-67.

Ross JS, McKenna BJ. The HER-2/neu oncogene in tumors of the gastrointestinal tract. *Cancer Invest*. 2001;19(5):554-68.

Ross JS, Fletcher JA, Bloom KJ, Linette GP, Stec J, Symmans WF, Puztai L, Hortobagyi GN. Targeted therapy in breast cancer: the HER-2/neu gene and protein. *Mol Cell Proteomics*. 2004 Apr;3(4):379-98. Epub 2004 Feb 3

Ross HJ, Blumenschein GR Jr, Aisner J, Damjanov N, Dowlati A, Garst J, Rigas JR, Smylie M, Hassani H, Allen KE, Leopold L, Zaks TZ, Shepherd FA. Randomized phase II multicenter trial of two schedules of lapatinib as first- or second-line monotherapy in patients with advanced or metastatic non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2010 Mar 15;16(6):1938-49. Epub 2010 Mar 9.

Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, Puztai L, Ravdin PM, Hortobagyi GN. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist*. 2009 Apr;14(4):320-68. Epub 2009 Apr 3.

Roth AD, Fazio N, Stupp R, Falk S, Bernhard J, Saletti P, Köberle D, Borner MM, Rufibach K, Maibach R, Wernli M, Leslie M, Glynn-Jones R, Widmer L, Seymour M, de Braud F; Swiss Group for Clinical Cancer Research. Docetaxel, cisplatin, and fluorouracil; docetaxel and cisplatin; and epirubicin, cisplatin, and fluorouracil as systemic treatment for advanced gastric carcinoma: a randomized phase II trial of the Swiss Group for Clinical Cancer Research. *J Clin Oncol*. 2007; 25(22):3217-23.

Rougier P, Lasser P, Ducreux M, Mahjoubi M, Bognel C, Elias D. Preoperative chemotherapy of locally advanced gastric cancer. *Ann Oncol*. 1994;5 Suppl 3:59-68

Roukos DH, Lorenz M, Encke A. Evidence of survival benefit of extended (D2) lymphadenectomy in western patients with gastric cancer based on a new concept: a prospective long-term follow-up study. *Surgery*. 1998; 123(5):573-8.

Roukos DH. Therapeutic value of D2-resection in gastric cancer evaluated with a new concept. UICC Consensus Conference. In: Kim JP, Min JS, Mok YJ, editors. Proceedings of the 3rd International Gastric Cancer Congress, Seoul 1999. Bologna: Editore; 1999. p.29–33.

Roy P, Piard F, Dusserre-Guion L et al. Prognostic comparison of the pathological classifications of gastric cancer: a population-based study. *Histopathology*. 1998 Oct; 33(4):304-10.

## S

Sakai K, Mori S, Kawamoto T, Taniguchi S, Kobori O, Morioka Y, Kuroki T, Kano K. Expression of epidermal growth factor receptors on normal human gastric epithelia and gastric carcinomas. *J Natl Cancer Inst*. 1986 Nov;77(5):1047-52.

Sakamoto J, Nakazato H, Teramukai S, Ohashi Y, Takahashi Y, Mai M, Toge T, Okura H, Kodaira S, Maetani S, Okajima K, Nomoto K, Hattori T, Inokuchi K. Association between preoperative plasma CEA levels and the prognosis of gastric cancer following curative resection. Tumor Marker Committee, Japanese Foundation for Multidisciplinary Treatment of Cancer, Tokyo, Japan. *Surg Oncol*. 1996; 5(3):133-9.

Sakuramoto S, Sasako M, Yamaguchi T, Kinoshita T, Fujii M, Nashimoto A, Furukawa H, Nakajima T, Ohashi Y, Imamura H, Higashino M, Yamamura Y, Kurita A, Arai K; ACTS-GC Group. Adjuvant chemotherapy for gastric cancer with S-1, an oral fluoropyrimidine. *N Engl J Med*. 2007; 357(18):1810-20.

Sanz-Ortega J, Steinberg SM, Moro E, Saez M, Lopez JA, Sierra E, Sanz-Esponera J, Merino MJ. Comparative study of tumor angiogenesis and immunohistochemistry for p53, c-ErbB2, c-myc and EGFr as prognostic factors in gastric cancer. *Histol Histopathol*. 2000 Apr;15(2):455-62.

Sasako M, McCulloch P, Kinoshita T, Maruyama K. New method to evaluate the therapeutic value of lymph node dissection for gastric cancer. *Br J Surg* 1995; 82:346-351.

Sasano H, Date F, Imatani A, Asaki S, Nagura H. Double immunostaining for c-erbB-2 and p53 in human stomach cancer cells. *Hum Pathol*. 1993 Jun;24(6):584-9.

Satoh T, Leon J, Lopez RI, Ferry DR, Bang Y, Van Cutsem E, Al-Sakaff, Hill JN, Donelson Trease S, Aprile G. Quality of life results from a phase III trial of trastuzumab plus chemotherapy in first-line HER2-positive advanced gastric and GE junction cancer. 2010 Gastrointestinal Cancers Symposium. Abstract 7.

Sato-Kuwabara Y, Neves JI, Fregnani JH, Sallum RA, Soares FA. Evaluation of gene amplification and protein expression of HER-2/neu in esophageal squamous cell carcinoma using Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) and immunohistochemistry. *BMC Cancer*. 2009 Jan 7;9:6.



Sauter G, Simon R, Hillan K. Tissue microarrays in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2003 Dec;2(12):962-72.

Sauter G, Lee J, Bartlett JM, Slamon DJ, Press MF. Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol*. 2009 Mar 10;27(8):1323-33. Epub 2009 Feb 9.

Scartozzi M, Galizia E, Freddari F, Berardi R, Cellerino R, Cascinu S. Molecular biology of sporadic gastric cancer: prognostic indicators and novel therapeutic approaches. *Cancer Treat Rev*. 2004 Aug;30(5):451-9.

Scartozzi M, Galizia E, Verdecchia L, Berardi R, Graziano F, Catalano V, Giordani P, Mari D, Silva RR, Marmorale C, Zingaretti C, Cascinu S. Lymphatic, blood vessel and perineural invasion identifies early-stage high-risk radically resected gastric cancer patients. *Br J Cancer*. 2006 Aug 21;95(4):445-9.

Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ, Drebin JA, Greene MI, Weinberg RA. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature*. 1984 Dec 6-12;312(5994):513-6.

Schnitt SJ. Breast cancer in the 21st century: neu opportunities and neu challenges. *Mod Pathol*. 2001 Mar;14(3):213-8.

Schnitzler G, Queisser W, Heim ME, König H, Katz R, Fritze D, Herrmann R, Arnold H, Henss H, Trux FA, et al Phase III study of 5-FU and carmustine versus 5-FU, carmustine, and doxorubicin in advanced gastric cancer. *Cancer Treat Rep*. 1986; 70(4):477-9.

Schraml P, Kononen J, Bubendorf L, Moch H, Bissig H, Nocito A, Mihatsch MJ, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clin Cancer Res*. 1999 Aug;5(8):1966-75.

Schwartz GK, Ilson D, Saltz L, O'Reilly E, Tong W, Maslak P, Werner J, Perkins P, Stoltz M, Kelsen D. Phase II study of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol administered to patients with advanced gastric carcinoma. *J Clin Oncol*. 2001; 19(7):1985-92.

Shah MA, Ramanathan RK, Ilson DH, Levrnor A, D'Adamo D, O'Reilly E, Tse A, Trocola R, Schwartz L, Capanu M, Schwartz GK, Kelsen DP. Multicenter phase II study of irinotecan, cisplatin, and bevacizumab in patients with metastatic gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma. *J Clin Oncol*. 2006; 24(33):5201-6.

Shinmura K, Goto M, Tao H et al. A novel STK11 germline mutation in two siblings with Peutz-Jeghers syndrome complicated by primary gastric cancer. *Clin Genet* 2005; 67:81-86.

Shinmura K, Kohno T, takasashi M. Familial gastric cancer: clinicopathological characteristics, RER phenotype, and germline p53 and E-cadherin mutations. *Carcinogenesis* 1999; 20:1127-1131.

Shousha S, Peston D, Amo-Takyi B, Morgan M, Jasani B. Evaluation of automated silver-enhanced *in situ* hybridization (SISH) for detection of HER2 gene amplification in breast carcinoma excision and core biopsy specimens. *Histopathology*. 2009 Jan;54(2):248-53.

Shun CT, Wu Ms, Lin JT et al. Relationship of p53 and c-erbB2-2 expression to histopathological features, *Helicobacter pylori* infection and prognosis in gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 1997; 44: 604-609.

Sjödahl K, Lu Y, Nilsen TI et al. Smoking and alcohol drinking in relation to risk of gastric cancer: a population-based, prospective cohort study. *Int J Cancer* 2007;120: 128-132.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987 Jan 9;235(4785):177-82.

Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989 May 12;244(4905):707-12.

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against *HER2* for metastatic breast cancer that overexpresses *HER2*. *N Engl J Med*. 2001 Mar 15;344(11):783-92.

Slamon D, Eineman W, Robert N et al. Phase III randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel (ACT) with doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel and trastuzumab (ACTH) with docetaxel, carboplatin and trastuzumab (TCH) in *HER2* positive early breast cancer patients: BCIRG 006 study. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 94: S5 (abstr 1).

Song ZJ, Gong P, Wu YE. Relationship between the expression of iNOS, VEGF, tumor angiogenesis and gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2002; 8(4):591-5

Suda Y, Kuwashima Y, Tanaka Y, Uchida K, Akazawa S. Immunohistochemical detection of thymidylate synthase in advanced gastric cancer: a prognostic indicator in patients undergoing gastrectomy followed by adjuvant chemotherapy with 5-fluoropyrimidines. *Anticancer Res*. 1999; 19(1B):805-10.

**T**

Tahara E, Semba S, Tahara H. Molecular biological observations in gastric cancer. *Semin Oncol.* 1996; 23(3):307-15.

Takagane A, Terashima M, Abe K, Araya M, Irinoda T, Yonezawa H, Nakaya T, Inaba T, Oyama K, Fujiwara H, Saito K. Evaluation of the ratio of lymph node metastasis as a prognostic factor in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer.* 1999 Aug;2(2):122-128.

Takehana T, Kunitomo K, Kono K, Kitahara F, Iizuka H, Matsumoto Y, Fujino MA, Ooi A. Status of c-erbB-2 in gastric adenocarcinoma: a comparative study of immunohistochemistry, fluorescence *in situ* hybridization and enzyme-linked immunosorbent assay. *Int J Cancer.* 2002 Apr 20;98(6):833-7.

Tanaka M, Kitajima Y, Sato S, Miyazaki K. Combined evaluation of mucin antigen and E-cadherin expression may help select patients with gastric cancer suitable for minimally invasive therapy. *Br J Surg.* 2003; 90(1):95-101.

Tanner M, Gancberg D, Di Leo A, Larsimont D, Rouas G, Piccart MJ, Isola J. Chromogenic *in situ* hybridization: a practical alternative for fluorescence *in situ* hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. *Am J Pathol.* 2000 Nov;157(5):1467-72.

Tanner M, Järvinen P, Isola J. Amplification of HER-2/neu and topoisomerase IIalpha in primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res.* 2001 Jul 15;61(14):5345-8.

Tanner M, Hollmén M, Junttila TT, Kapanen AI, Tammola S, Soini Y, Helin H, Salo J, Joensuu H, Sihvo E, Elenius K, Isola J. Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase IIalpha gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. *Ann Oncol.* 2005 Feb;16(2):273-8.

Tapia C, Glatz K, Novotny H, Lugli A, Horcic M, Seemayer CA, Tornillo L, Terracciano L, Spichtin H, Mirlacher M, Simon R, Sauter G. Close association between HER-2 amplification and overexpression in human tumors of non-breast origin. *Mod Pathol.* 2007 Feb;20(2):192-8.

Tateishi M, Toda T, Minamisono Y, Nagasaki S. Clinicopathological significance of c-erbB-2 protein expression in human gastric carcinoma. *J Surg Oncol.* 1992 Apr;49(4):209-12.

Terry MB, Gaudet MM, Gammon MD. The epidemiology of gastric cancer. *Semin Radiat Oncol* 2002; 12:111-127.

Thomas JP, Tutsch KD, Cleary JF, Bailey HH, Arzoomanian R, Alberti D, Simon K, Feierabend C, Binger K, Marnocha R, Dresen A, Wilding G. Phase I clinical and pharmacokinetic trial of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2002; 50(6):465-72. Epub 2002 Oct 2.

Thuss-Patience PC, Kretschmar A, Repp M, Kingreen D, Henneser D, Micheel S, Pink D, Scholz C, Dörken B, Reichardt P. Docetaxel and continuous-infusion fluorouracil versus epirubicin, cisplatin, and fluorouracil for advanced gastric adenocarcinoma: a randomized phase II study. *J Clin Oncol.* 2005; 23(3):494-501.

Tomb JF, White O, Kerlavage AR et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature.* 1997 7; 388: 539-547. Erratum in: *Nature* 1997 Sep 25; 389(6649):412.

Trarbach T, Schleucher N, Weber D, Tillner J, Fassmann I, Seeber S, Vanhoefer U. Phase I study of the humanized anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody EMD 72000 (matuzumab) in combination with cisplatin, 5-fluorouracil and leucovorin (PFL) in patients (pts) with advanced esophago-gastric (EG) adenocarcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 2005 ASCO Annual Meeting Proceedings. Vol 23, No. 16S, Part I of II (June 1 Supplement), 2005: 3156

Tubbs RR, Pettay J, Roche P, Stoler MH, Jenkins R, Myles J, Grogan T. Concomitant oncoprotein detection with fluorescence *in situ* hybridization (CODFISH): a fluorescence-based assay enabling simultaneous visualization of gene amplification and encoded protein expression. *J Mol Diagn.* 2000 May; 2(2):78-83.

Tubbs RR, Pettay JD, Roche PC, Stoler MH, Jenkins RB, Grogan TM. Discrepancies in clinical laboratory testing of eligibility for trastuzumab therapy: apparent immunohistochemical false-positives do not get the message. *J Clin Oncol.* 2001 May 15;19(10):2714-21.

Tubbs R, Pettay J, Skacel M, Powell R, Stoler M, Roche P, Hainfeld J. Gold-facilitated *in situ* hybridization: a bright-field autometallographic alternative to fluorescence *in situ* hybridization for detection of Her-2/neu gene amplification. *Am J Pathol.* 2002 May;160(5):1589-95.

Tubbs R, Pettay J, Powell R et al. Enzyme metallography (EnzMet): a novel second generation bright field assay for detection of HER2 gene amplification in breast carcinoma. *J Mol Diagn (AMP 2003 Meeting Abstracts)* 2003; 5 :279.

Tubbs R, Pettay J, Hicks D, Skacel M, Powell R, Grogan T, Hainfeld J. Novel bright field molecular morphology methods for detection of HER2 gene amplification. *J Mol Histol.* 2004 Aug;35(6):589-94.

Tubbs RR, Pettay J, Skacel M et al. Gold and silver-facilitated metallographic *in situ* hybridization procedures for detection of HER2 gene amplification. En:Hacker GW, Tubbs RR (editors) Molecular Morphology in human tissues. Boca Raton FL, CRC Press, 2005. Pags 101-106.

Tubbs RR, Hicks DG, Cook J, Downs-Kelly E, Pettay J, Hartke MB, Hood L, Neelon R, Myles J, Budd GT, Moore HC, Andresen S, Crowe JP. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) as primary methodology for the assessment of HER2 Status in adenocarcinoma of the breast: a single institution experience. Diagn Mol Pathol. 2007 Dec;16(4):207-10.

Tubbs R, Myles J, Papouchado B et al. Inter-observer interpretative reproducibility of HER2 genotyping of a consecutive series of primary breast carcinomas by silver *in situ* hybridization (SISH). Breast Cancer Res Treat. 2007; 106 (suppl 1): S86: Abstract 2008.

## U

Uchino S, Tsuda H, Maruyama K, Kinoshita T, Sasako M, Saito T, Kobayashi M, Hirohashi S. Overexpression of c-erbB-2 protein in gastric cancer. Its correlation with long-term survival of patients. Cancer. 1993 Dec 1;72(11):3179-84.

Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S et al. Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer. N Engl J Med 2001; 345:784-789.

Ugocsai K, Mándoky L, Tiszlavicz L, Molnár J. Investigation of *HER2* overexpression in non-small cell lung cancer. Anticancer Res. 2005 Jul-Aug;25(4):3061-6.

UICC (International Union against Cancer). en Sobin LH, Wittekind CH; Editores. TNM classification of malignant tumors. 5th edition. New York, Chichester, Weinhei, Brisbane, Singapur, Toronto. Wiley-Liss Book; 1997.

Ursini-Siegel J, Schade B, Cardiff RD, Muller WJ. Insights from transgenic mouse models of ERBB2-induced breast cancer. Nat Rev Cancer. 2007 May;7(5):389-97. Epub 2007 Apr 19.

## V

Vainio H, Bianchini F eds. *IARC Handbook of Cancer Prevention, Vol 8: Fuits and Vegetables*. Lion, Francia. IARC Press; 2003.

Valabrega G, Montemurro F, Sarotto I, Petrelli A, Rubini P, Tacchetti C, Aglietta M, Comoglio PM, Giordano S. TGFalpha expression impairs Trastuzumab-induced *HER2* downregulation. Oncogene. 2005 Apr 21;24(18):3002-10.

Van Cutsem E, Moiseyenko VM, Tjulandin S, Majlis A, Constenla M, Boni C, Rodrigues A, Fodor M, Chao Y, Voznyi E, Risse ML, Ajani JA; V325 Study Group. Phase III study of docetaxel and cisplatin plus fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil as first-line therapy for advanced gastric cancer: a report of the V325 Study Group. *J Clin Oncol*. 2006 Nov 1;24(31):4991-7.

Van Cutsem E, Kang Y, Chung H, Shen L, Sawaki A, Lordick F, Hill J, Lehle M, Feyereislova A, Bang Y. Efficacy results from the ToGA trial: A phase III study of trastuzumab added to standard chemotherapy (CT) in first-line human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive advanced gastric cancer (GC). *J Clin Oncol* 27:18s, 2009 (suppl; abstr LBA4509)

Van de Vijver M, Rueschoff J, Penault-Llorca F et al. Chromogenic in-situ hybridization (CISH) compared with FISH and *IHQ* for detection of HER2 gene amplification: an international validation study. Poster 342 presentado en el 26th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium; Diciembre 3-6, 2003; San Antonio TR, USA.

Van Krieken JH, Sasako M, van de Velde CJ. *Gastric Cancer* en Prognostic Factors in Cancer. Editores: GospodarowiczMK, Henson DE, Hutter RVP, O`Sullivan B, Sobin LH, Wittekind C. New York:Wiley –Liss; 2001. Pags 251-261.

Vanhoefer U, Rougier P, Wilke H, Ducreux MP, Lacave AJ, Van Cutsem E, Planker M, Santos JG, Piedbois P, Paillot B, Bodenstern H, Schmoll HJ, Bleiberg H, Nordlinger B, Couvreur ML, Baron B, Wils JA. Final results of a randomized phase III trial of sequential high-dose methotrexate, fluorouracil, and doxorubicin versus etoposide, leucovorin, and fluorouracil versus infusional fluorouracil and cisplatin in advanced gastric cancer: A trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Tract Cancer Cooperative Group. *J Clin Oncol*. 2000; 18(14):2648-57.

Vaziri SA, Tubbs RR, Darlington G, Casey G. Absence of CCND1 gene amplification in breast tumours of BRCA1 mutation carriers. *Mol Pathol*. 2001 Aug; 54(4):259-63.

Vera-Román JM, Rubio-Martínez LA. Comparative assays for the HER-2/neu oncogene status in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2004 Jun;128(6):627-33.

Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jul;2(7):489-501.

Vladich F, Pestic-Dragovich L, McElhinny AS et al. A rapid, automated silver *in situ* hybridization (SISH) detection assay for HER2 gene status determination in breast carcinoma. Presentado en 2007 ASCO Breast Cancer Symposium. Septiembre 7-8, 2007. San Francisco, California, USA . Abstract 89

**W**

Wagner AD, Grothe W, Haerting J, Kleber G, Grothey A, Fleig WE. Chemotherapy in advanced gastric cancer: a systematic review and meta-analysis based on aggregate data. *J Clin Oncol*. 2006; 24(18):2903-9.

Wanebo HJ, Kennedy BJ, Winchester DP, Stewart AK, Fremgen AM. Role of splenectomy in gastric cancer surgery: adverse effect of elective splenectomy on longterm survival. *J Am Coll Surg*. 1997; 185(2):177-84.

Wang SE, Narasanna A, Perez-Torres M, Xiang B, Wu FY, Yang S, Carpenter G, Gazdar AF, Muthuswamy SK, Arteaga CL. *HER2* kinase domain mutation results in constitutive phosphorylation and activation of *HER2* and EGFR and resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Cell*. 2006 Jul;10(1):25-38.

Wang YI, Sheu BS, Yang HB et al. Overexpression of c-erb-B2 protein in tumor and non-tumor parts of gastric adenocarcinoma: emphasis on its relation to *H.Pylori* infection and clinicohistological characteristics. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 1172-1176.

Wang YP, Bennett C, Pan T. Endoscopic mucosal resection for early gastric cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006;(1).

Watanabe T, Tada M, Nagai H et al. Helicobacter pylori infection induces gastric cancer in mongolian gerbils. *Gastroenterology* 1998; 115:642-648.

Waters JS, Norman A, Cunningham D, Scarffe JH, Webb A, Harper P, Joffe JK, Mackean M, Mansi J, Leahy M, Hill A, Oates J, Rao S, Nicolson M, Hickish T. Long-term survival after epirubicin, cisplatin and fluorouracil for gastric cancer: results of a randomized trial. *Br J Cancer*. 1999; 80(1-2):269-72.

Webb A, Cunningham D, Scarffe JH, Harper P, Norman A, Joffe JK, Hughes M, Mansi J, Findlay M, Hill A, Oates J, Nicolson M, Hickish T, O'Brien M, Iveson T, Watson M, Underhill C, Wardley A, Meehan M. Randomized trial comparing epirubicin, cisplatin, and fluorouracil versus fluorouracil, doxorubicin, and methotrexate in advanced esophagogastric cancer. *J Clin Oncol*. 1997; 15(1):261-7.

Wilke H, Preusser P, Fink U, Achterrath W, Meyer HJ, Stahl M, Lenaz L, Meyer J, Siewert JR, Geerlings H, et al New developments in the treatment of gastric carcinoma. *Semin Oncol*. 1990; 17(1 Suppl 2):61-70.

Wils JA, Klein HO, Wagener DJ, Bleiberg H, Reis H, Korsten F, Conroy T, Fickers M, Leyvraz S, Buyse M, et al. Sequential high-dose methotrexate and fluorouracil combined with doxorubicin--a step ahead in the treatment of advanced gastric cancer: a trial of the

European Organization for Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Tract Cooperative Group. J Clin Oncol. 1991; 9(5):827-31.

Wilson D, Hiller L, Geh JI. Review of second-line chemotherapy for advanced gastric adenocarcinoma. Clin Oncol (R Coll Radiol). 2005; 17(2):81-90.

Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. J Clin Oncol. 2007 Jan 1;25(1):118-45. Epub 2006 Dec 11

World Health Organization. Tumours of the stomach. En Hamilton SR, Aaltonen La. World Health Organization classification of Tumours. Tumours of the digestive system. Lyon: IARC Press; 2000, P 37-68

Wu M, Davidson N. Transmission electron microscopic method for gene mapping on polytene chromosomes by *in situ* hybridization. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981 Nov;78(11):7059-63.

Wu MS, Lee CW, Shun CT, Wang HP, Lee WJ, Chang MC, Sheu JC, Lin JT. Distinct clinicopathologic and genetic profiles in sporadic gastric cancer with different mutator phenotypes. Genes Chromosomes Cancer. 2000; 27(4):403-11.

Wu MS, Shun CT, Wang HP, Sheu JC, Lee WJ, Wang TH, Lin JT. Genetic alterations in gastric cancer: relation to histological subtypes, tumor stage, and Helicobacter pylori infection. Gastroenterology. 1997 May;112(5):1457-65.

## Y

Yang L. Incidence and mortality of gastric cancer in China. World J Gastroenterol 2006; 12:17-20.

Yano T, Doi T, Ohtsu A, Boku N, Hashizume K, Nakanishi M, Ochiai A. Comparison of HER2 gene amplification assessed by fluorescence *in situ* hybridization and HER2 protein expression assessed by immunohistochemistry in gastric cancer. Oncol Rep. 2006 Jan;15(1):65-71.

Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001 Feb;2(2):127-37.



Yasuda K, Shiraishi N, Suematsu T, Yamaguchi K, Adachi Y, Kitano S. Rate of detection of lymph node metastasis is correlated with the depth of submucosal invasion in early stage gastric carcinoma. *Cancer*. 1999; 85(10):2119-23

Yaziji H, Goldstein LC, Barry TS, Werling R, Hwang H, Ellis GK, Gralow JR, Livingston RB, Gown AM. HER-2 testing in breast cancer using parallel tissue-based methods. *JAMA*. 2004 Apr 28;291(16):1972-7.

Yeh KH, Shun CT, Chen CL, Lin JT, Lee WJ, Lee PH, Chen YC, Cheng AL. High expression of thymidylate synthase is associated with the drug resistance of gastric carcinoma to high dose 5-fluorouracil-based systemic chemotherapy. *Cancer*. 1998; 82(9):1626-31.

Yonemura Y, Ninomiya I, Ohoyama S, Fushida S, Kimura H, Tsugawa K, Kamata T, Yamaguchi A, Miyazaki I, Endou Y, et al. Correlation of c-erbB-2 protein expression and lymph node status in early gastric cancer. *Oncology*. 1992;49(5):363-7.

Yonemura Y, Ninomiya I, Yamaguchi A, Fushida S, Kimura H, Ohoyama S, Miyazaki I, Endou Y, Tanaka M, Sasaki T. Evaluation of immunoreactivity for erbB-2 protein as a marker of poor short term prognosis in gastric cancer. *Cancer Res*. 1991 Feb 1;51(3):1034-8.

Yonemura Y, Sawa T, Kinoshita K, Matsuki N, Fushida S, Tanaka S, Ohoyama S, Takashima T, Kimura H, Kamata T, et al. Neoadjuvant chemotherapy for high-grade advanced gastric cancer. *World J Surg*. 1993; 17(2):256-61.

Yonemura Y, Ninomiya I, Tsugawa K, Fushida S, Fujimura T, Miyazaki I, Uchibayashi T, Endou Y, Sasaki T. Prognostic significance of c-erbB-2 gene expression in the poorly differentiated type of adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Detect Prev*. 1998;22(2):139-46.

Yoo SB, Lee HJ, Park JO, Choe G, Chung DH, Seo JW, Chung JH. Reliability of chromogenic *in situ* hybridization for epidermal growth factor receptor gene copy number detection in non-small-cell lung carcinomas: a comparison with fluorescence *in situ* hybridization study. *Lung Cancer*. 2010 Mar;67(3):301-5. Epub 2009 Jun 7.

Yu GZ, Chen Y, Wang JJ. Overexpression of Grb2/HER2 signaling in Chinese gastric cancer: their relationship with clinicopathological parameters and prognostic significance. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2009 Oct;135(10):1331-9. Epub 2009 Apr 1.

Yu W, Choi GS, Chung HY. Randomized clinical trial of splenectomy versus splenic preservation in patients with proximal gastric cancer. *Br J Surg*. 2006; 93(5):559-63.

Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*. 2008 Sep 18;27(41):5497-510.

## Z

Zhang D, Salto-Tellez M, Do E, Putti TC, Koay ES. Evaluation of HER-2/neu oncogene status in breast tumors on tissue microarrays. *Hum Pathol*. 2003 Apr;34(4):362-8.

Zhang H, Wu J, Meng L, Shou CC. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors KDR and Flt-1 in gastric cancer cells. *World J Gastroenterol*. 2002; 8(6):994-8

Zhang XL, Yang YS, Xu DP, Qu JH, Guo MZ, Gong Y, Huang J. Comparative study on overexpression of HER2/neu and HER3 in gastric cancer. *World J Surg*. 2009 Oct;33(10):2112-8.

Zhou YN, Xu CP, Han B, Li M, Qiao L, Fang DC, Yang JM. Expression of E-cadherin and beta-catenin in gastric carcinoma and its correlation with the clinicopathological features and patient survival. *World J Gastroenterol*. 2002; 8(6):987-93.

Zuo T, Wang L, Morrison C, Chang X, Zhang H, Li W, Liu Y, Wang Y, Liu X, Chan MW, Liu JQ, Love R, Liu CG, Godfrey V, Shen R, Huang TH, Yang T, Park BK, Wang CY, Zheng P, Liu Y. FOXP3 is an X-linked breast cancer suppressor gene and an important repressor of the HER-2/ErbB2 oncogene. *Cell*. 2007 Jun 29;129(7):1275-86. Epub 2007 Jun 14.

# ABREVIATURAS

5-Fu: 5 fluorouracilo.

ACG: adenocarcinoma gástrico.

ADN: Acido desoxirribonucleico.

AJCC: American Joint Committee on Cancer

APC: Adenomatous Polyposis of the colum.

ARN: Acido Ribonucleico.

ASCO: American Society of Clinical Oncology.

CAP: Colegio Americano de Patología.

CEA: Antígeno carcinoembrionario.

CEP 17: Centrómero del Cromosoma 17.

CG: Cáncer gástrico.

CGA: Cáncer gástrico avanzado.

CISH: Cromogenic *in situ* hybridization.

CISH-dc: dual colour Cromogenic *in situ* hybridization.

EGC: Early Gastric Cancer.

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor.

EMA: European Medicines Agency.

ERCC1: excision Repair cross-complementing gen 1.

FDA: Food and Drug Administration.

FISH: Fuorescent *in situ* hybridization.

HER2: Human epidermal growth factor 2.

HNPCC: Hereditary Non Poliposic Colon Cancer.

HR: Hazard Ratio.

IARC: International Agency for Research on Cancer.

IHQ: inmunohistoquímica.

MAbs: monoclonal antibodies.

MAPK: mitogen activated protein kinases.

MMPs: metaloproteinasas de la matriz extracelular.

MSI: Microsatellite instability

mTOR: mamlian Target of Rapamicyn.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

RT-PCR: Real-time Polymerase Chain reaction.

SISH: Silver-enhanced *in situ* hybridization.

SISH-dc: dual colour Silver-enhanced *in situ* hybridization.

TOPII $\alpha$ : Topoisomerasa II $\alpha$ .

UGE: union gastro-esofágica.

UJCC: International Union Against Cancer.

VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor.

WHO: World Health Organization.